

# UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



## FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I  
PARASITOLOGIA

Programa "Neurociències Bàsiques i Aplicades"

"ESTUDIO MORFOLÓGICO PROTEICO Y MOLECULAR DE LA  
HIPER-CK-EMIA ASINTOMÁTICA O PAUCISINTOMÁTICA"

**M<sup>a</sup> PILAR MARTÍ MARTÍNEZ**  
**2015**

**DIRECTOR:**

**Prof. Dr. Juan J. Vílchez Padilla**

**Departament de Medicina / ISS la FE / CIBERER**

**TUTOR:**

**Dr. Juan Nacher Roselló**

**Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia**



# UNIVERSITAT DE VALÈNCIA



## FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES

### DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR I PARASITOLOGIA

Programa "Neurociències Bàsiques i Aplicades"

**"ESTUDIO MORFOLÓGICO PROTEICO Y MOLECULAR DE LA  
HIPER-CK-EMIA ASINTOMÁTICA O PAUCISINTOMÁTICA"**

**Ma PILAR MARTÍ MARTÍNEZ**

**2015**



**DIRECTOR:**

**Prof. Dr. Juan J. Vílchez Padilla**

Departament de Medicina / ISS la FE / CIBERER

**TUTOR:**

**Dr. Juan Nacher Roselló**

Departament de Biologia Cel.lular i Parasitologia





Tesis Doctoral presentada por **Dña. M.PILAR MARTÍ MARTÍNEZ** dentro del programa **“Neurociencias Básicas y Aplicadas”** para aspirar al grado de **Doctora, Mención Internacional** por la Universidad de Valencia, dirigida por **Prof. Dr. JUAN J. VILCHEZ PADILLA.**

Valencia, 23 de Octubre de 2015

Fdo. M. Pilar Martí Martínez





**D. Juan Jesús Vílchez Padilla**, Doctor en Medicina por la  
Universidad de Valencia,

CERTIFICA:

Que **Dña. M<sup>a</sup> Pilar Martí Martínez**, licenciada en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“ESTUDIO MORFOLOGICO PROTEICO Y MOLECULAR DE LA HIPER-CK-EMIA ASINTOMÁTICA O PAUCISINTOMÁTICA”**, para la obtención del Grado de Doctora.

En Valencia, a 23 de Octubre de 2015

Dr. Juan Jesús Vílchez Padilla



**D. Juan Nacher Roselló**, Doctor en Ciencias Biológicas por la  
Universidad de Valencia,

CERTIFICA:

Que **Dña. M<sup>a</sup> Pilar Martí Martínez**, licenciada en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado el trabajo titulado **“ESTUDIO MORFOLOGICO PROTEICO Y MOLECULAR DE LA HIPER-CK-EMIA ASINTOMÁTICA O PAUCISINTOMÁTICA”**, para la obtención del Grado de Doctora, bajo mi tutela.

En Valencia, a 23 de Octubre de 2015

Dr. Juan Nacher Resello



DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE  
Direttore: Prof. Domenico d'Avella  
Via Giustiniani, 5  
35128 Padova - Italy



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Padova, 01/07/2011

Si certifica che la dr.ssa Pilar Martí, del Servicio de Neurología Experimental, Hospital Universitario La Fe, Avenida de Campanar 21 di Valencia, frequenterà il Laboratorio Neuromuscolare del Dipartimento di Neuroscienze, dal 1° luglio 2011 al 30 settembre 2011.



Distinti saluti

Prof.ssa Elena Pegoraro





---

Padova, 30/09/2011

To whom it may concern

I certify that dr. Martin Pilar has been in my Neuromuscular Center and Neuromuscular Laboratory until the end of September, as part of her PhD thesis on the pathogenesis of Limb-girdle and mitochondrial myopathies in patient with hyperCKemia. She has been particular active in applying immunohistochemistry, molecular analysis and western blotting technique in the biopsies of these patients. She has identified defect of caveolin and mitochondrial myopathies.

Sincerely yours

Corrado Angelini, MD







## EL VOCAL



*Cualesquiera que hayan sido nuestros logros, alguien nos ayudó siempre a  
alcanzarlos*

***Althea Gibson***

*La ciencia apenas sirve más que para darnos una idea de la extensión de  
nuestra ignorancia*

***Lamennais***

*En el punto donde se detiene la ciencia, empieza la imaginación*

***Heyendhal***

*La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante*

***Miguel de Unamuno***



**A mis padres (Pilar y José)  
y mis tíos (Carmen y José)**



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimiento al Dr. Juan J. Vílchez por sus conocimientos y enseñanzas transmitidas a lo largo de estos años. Bajo su tutela, ha hecho sentirme una privilegiada. Gracias a su excelente dirección ha sido posible la Tesis Doctoral.

A mis padres, por la educación que me dieron y por no haberme negado nunca su ayuda. Gracias a su apoyo, a su fe ciega en mis posibilidades, a su esfuerzo, amor y plena dedicación he podido llegar hasta aquí. Este trabajo va dedicado a ellos, como pequeña muestra del amor y cariño que les tengo.

Al Dr. Fernando Mayordomo que me ha enseñado todo lo que he aprendido para poder interpretar las biopsias musculares al microscopio, gracias por tu ayuda.

A la Dra. Inmaculada Azorín, por su ayuda en la realización y puesta a punto de diferentes técnicas.

A los Drs. Nuria Muelas, Teresa Sevilla y Luis Bataller, que me han ayudado en la parte clínica, de la cual yo no tenía mucha idea al comienzo de este trabajo.

A la Dra. M<sup>a</sup>Jose Chumillas por su ayuda en los estudios de EMG.

A los técnicos de laboratorio Roger Vílchez y Lorena Gómez por su ayuda en el transporte y procesado de las muestras musculares.

A Chema Millan y Teresa Jaijo por su colaboración en diferentes análisis genéticos.



A Amets, Ohiane, Mirren y Adolfo por dejarme compartir su laboratorio y aprender un poco más de genética y como no de la calpaina. Muchas gracias ha sido un placer compartir con vosotros una parte de esta tesis.

A Pia Gallano por su colaboración en diferentes análisis genéticos.

A Corrado Angelini, Marina Fanin y todo el grupo de neuromuscular por dejarme compartir su laboratorio unos meses pudiendo comparar los procesados de muestras y su colaboración en análisis genéticos. Muchas gracias por vuestra amabilidad y ayuda desinteresada, a sido un privilegio trabajar con vosotros.

A Madrid por su colaboración en el estudio de cadena respiratoria, CPTII y McArdel.

A Montse por su ayuda en las gestiones administrativas, gracias.

A mi compañera y amiga Sonia por su ayuda y apoyo y como no por esos ratos de desconexión del trabajo. Gracias

A mis amigos, por estar ahí permitiendo que me relajara cuando no estaba trabajando.

A ti David gracias por tu apoyo, comprensión y por estar siempre ahí, en la fase final de esta etapa que es el comienzo de grandes proyectos.

Como no a los pacientes que han participado de manera desinteresada en este estudio y que sin ellos no hubiera sido posible la realización de este proyecto.

Por último, dedicar unas líneas de agradecimiento a familiares, amigos y a todos aquellos que se han podido quedar en el tintero por mi mala memoria, pero que, de alguna manera, han aportado su granito de arena para realizar esta Tesis Doctoral.

Gracias a todos.



## RESUMEN

La HiperCKemia asintomática o paucisintomática es un síndrome que consiste en una actividad sérica elevada de la enzima creatin-quinasa (CK) de forma permanente y que puede representar una enfermedad muscular en forma benigna o en estadio preclínico. A menudo son idiopáticas y generan incertidumbre respecto al pronóstico a largo plazo.

El objetivo del estudio es analizar una serie de 354 casos que se han estudiado con biopsia muscular en un periodo de 15 años.

Pacientes y Métodos: Pacientes remitidos con niveles de CK sérica superiores a 250 UI/L en los que se han descartado causas primarias. Se estudiaron mediante: DBS Pompe, MLPA, EMG, RM, biopsia muscular (histológico y proteico) y análisis genéticos.

La serie está compuesta por 276 hombres y 78 mujeres. 85 casos son familiares y 49 son hiperCKemias mantenidas tras tratamiento con estatinas y 127 cursan absolutamente asintomáticos. La prueba de DBS para la enfermedad de pompe arroja una alta sensibilidad al igual que el MLPA del gen de la distrofina como pruebas previas a la biopsia muscular. El EMG no tiene una elevada sensibilidad pero puede ser de utilidad en algunos casos. La RM no tiene especificidad diagnóstica pero si presenta una elevada capacidad predictiva en la evolución. La biopsia mostro alteraciones en el 96% de los casos, resultando el 48% inespecíficos. El estudio proteico/enzimático mostro déficits en calpaina, distrofina, disferlina, caveolina, lamina, sarcoglicanos, alfa-distroglicano, miofosforilasa y cadena respiratoria mitocondrial; confirmando solo un 38% como causas primaria mediante el análisis genético.

El diseño de un panel de genes implicados en miopatías miofibrilares y distrofias de cinturas, aumento un 10% los casos diagnosticados. El análisis de la evolución de los pacientes con HCK, mostró que un 27% permanece asintomático y solo un 19% llegan a desarrollar debilidad. Con el conjunto de estudios realizados se diagnostica a un 35% de la serie llevando al planteamiento así una nueva estrategia de abordaje de las HCK y a la propuesta de un nuevo algoritmo diagnóstico.

Conclusiones: Nuestra casuística de hiperCKemias mantiene un perfil diferente en algunos puntos a las 3 grandes series internacionales publicadas (Prelle et al. 2002; Fernandez et al. 2006 y Fanin et al. 2009), las discrepancias se explican fundamentalmente por diferencias metodológicas como la aplicación de un panel genes que aumenta el rendimiento diagnóstico y a cambios regionales de prevalencia, aunque de todos modos el método clásico aplicado en un principio confirma el perfil que se describe en la guía de a EFNS (Kyriakides et al. 2008). Como puntos innovadores destacamos el uso de la RM como herramienta en la evolución de las HCK por su valor predictivo y la aplicación de un estudio genético con panel de genes previo a la biopsia. Los resultados nos llevan a proponer un nuevo algoritmo diagnóstico. El estudio de la evolución de los pacientes resultó relevante ya que demostró que un 81% de los pacientes permanecen como formas benignas, resultando un modelo natural de interés para el diseño de nuevas terapias y análisis de biomarcadores pronósticos.

## **ABSTRACT**

The paucisymptomatic and asymptomatic hyperCKemia are syndromes that may represent a muscle disease in a benign or pre-clinical stage. They are often idiopathic and generate uncertainty about the long-term prognosis.

The aim of the study is to analyze a series of 354 cases have been studied muscle biopsy over a period of 15 years.

Patients and Methods: Patients referred with serum CK levels above 250 IU / L in which primary causes have been excluded. They were studied by: DBS Pompe, MLPA, EMG, MRI, muscle biopsy (histological and protein) and genetic analysis.

The series consists of of 276 men and 78 women. 85 cases are familial and 49 are hyperckemias maintained after treatment with statins and 127 are absolutely asymptomatic. DBS test for Pompe and the MLPA gene dystrophin, yields high sensitivity as pre-tests muscle biopsy. The EMG does not have a high sensitivity but may be useful in some cases. MRI not have diagnostic specificity but if have a high predictive ability in evolution. The biopsy, showed alterations in 96% of cases, with 48% unspecific changes. The protein / enzyme study showed deficits in calpain, dystrophin, dysferlin, caveolin, lamin, sarcoglycans, alpha-dystroglycan, myophosphorylase and mitochondrial respiratory chain; confirming only 38% as primary causes through genetics. The design of a panel of genes involved in myofibrillar myopathies and LGMD, increased 10% diagnosed cases. The analysis of the evolution of patients with HCK, showed that 27% remained asymptomatic and only 19% go on to develop weakness. With the set of studies is diagnosed to

35% of the series leading to a new approach and strategy for dealing with the HCK and the proposal of a new diagnostic algorithm.

Conclusions: Our series of hiperCKemias has a different profile in some points to the 3 major international series published (Prelle et al 2002; Fernandez et al 2006 and Fanin et al 2009...), the differences are mainly explained by methodological differences as application a panel of genes to increase the diagnostic performance and regional changes in prevalence, but anyway the classic method applied at first, confirms the profile described in the guide to EFNS (Kyriakides et al. 2008). As innovative points include the use of MRI as a tool in the evolution of HCK for its predictive value and the implementation of a panel of genes before biopsy. The results lead us to propose a new diagnostic algorithm. The study of the evolution of patients was relevant because it showed that 81% of patients remain benign forms, resulting in a natural model of interest for the design of new therapies and analysis of prognostic biomarkers.

## **KEY WORDS**

HiperCKemia, LGMD, DMD, CK, POMPE, Biopsia muscular, MLPA, DBS, RM.

# INDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>31</b>
<b>LISTADO DE TABLAS.....</b>	<b>35</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS.....</b>	<b>37</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>41</b>
1.1 EL MÚSCULO .....	43
1.1.1 <i>BIOLOGÍA CELULAR .....</i>	<i>43</i>
1.1.2 <i>BIOLOGÍA MOLECULAR .....</i>	<i>45</i>
1.1.2.1 Proteínas Contráctiles.....	45
1.1.2.2 Proteínas Reguladoras.....	45
1.1.2.3 Proteínas Accesorias o Estructurales.....	45
<i>Figura 1: Esquema de la organización de la fibra muscular.....</i>	<i>46</i>
1.1.3 <i>ENZIMAS Y MUSCULO ESQUELETICO .....</i>	<i>46</i>
1.2 LA CREATIN-KINASA .....	48
1.3 HIPERCKEMIAS .....	49
1.3.1 <i>Niveles sanguíneos de CK en condiciones fisiológicas:.....</i>	<i>49</i>
1.3.2 <i>Valores límite de normalidad (LSN) de la CKs:.....</i>	<i>51</i>
1.3.3 <i>HiperCKemias secundarias: .....</i>	<i>52</i>
1.3.4 <i>HiperCKemia como expresión de una miopatía .....</i>	<i>54</i>
1.3.5 <i>HiperCKemia en enfermedades neuromusculares no miopáticas ....</i>	<i>56</i>
1.3.5.1 Procesos Neurógenos.....	56
1.3.5.2 Neuroacantocitosis (NA).....	56
1.3.5.3 Hipertermia Maligna .....	57
1.3.6 <i>Estudios específicos sobre hiperCKemias asintomática /</i> <i>paucisintomática.....</i>	<i>58</i>
1.3.7 <i>Variables que predicen una biopsia muscular resolutive .....</i>	<i>61</i>



1.3.7.1	Nivel de hiperCKemia .....	61
1.3.7.2	Papel de la electromiografía.....	61
1.3.7.3	Parámetros clínicos .....	62
1.3.8	<i>El pronóstico en pacientes con hiperCKemia pauci o asintomática..</i>	<i>63</i>
1.3.9	<i>Riesgo de hipertermia maligna (HM).....</i>	<i>63</i>
1.3.10	<i>Recomendaciones para el estudio de la Hiper-CK-emia</i> <i>Asintomática y Paucisintomática del comité de expertos de la EFNS. ....</i>	<i>64</i>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>67</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>71</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>75</b>
4.1	PACIENTES .....	79
4.2	DETERMINACIÓN DE CREATIN KINASA. ....	81
4.3	EXPLORACIÓN NEUROLÓGICA .....	82
4.4	VALORACIÓN DE LA DISCAPACIDAD FUNCIONAL .....	83
4.5	DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS/ENZIMATICAS .....	84
4.5.1	<i>DETERMINACIONES ESTANDAR O DE RUTINA.....</i>	<i>84</i>
4.5.2	<i>CURVA DEL ACIDO LÁCTICO.....</i>	<i>84</i>
4.5.3	<i>ACTIVIDAD ENZIMATICA DE ALFA GLUCOSIDASA ACIDA (GAA)</i> <i>PARA POMPE.....</i>	<i>84</i>
4.5.3.1	Determinación en sangre seca recogida sobre papel: .....	85
4.5.3.2	Determinación en linfocitos para Pompe:.....	86
4.6	ELECTROMIOGRAFIA (EMG) .....	87
4.7	IMAGEN: TAC O RM MUSCULAR.....	89
4.8	ESTUDIO DE BIOPSIA MUSCULAR.....	91
4.8.1	<i>OBTENCIÓN DE MUESTRAS .....</i>	<i>91</i>
4.8.2	<i>HISTOQUÍMICA CONVENCIONAL .....</i>	<i>92</i>
4.8.3	<i>MEDIDA PARA VARIABILIDAD DEL TAMAÑO DE FIBRAS:.....</i>	<i>96</i>

4.8.4	INMUNOHISTOQUÍMICA/INMUNOFLUORESCENCIA.....	97
4.8.5	INMUNOTRANSFERENCIA.....	101
4.8.6	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	103
4.9	ANÁLISIS ENZIMÁTICO.....	105
4.9.1	CADENA RESPIRATORIA:.....	105
4.10	ANÁLISIS GENÉTICOS.....	109
4.10.1	ESTUDIO DE LA CAVEOLINA-3, LAMINA, DISFERLINA, ANOS-5, RYR1, FKRP, McARDEL, POMPE, CPTII Y DISTROFINA.....	110
4.10.2	ESTUDIO MLPA DISTROFINA.....	111
4.10.3	PANEL CINTURAS/MIOFIBRILAR MEDIANTE TECNOLOGIA ION TORRENT.....	112
4.11	ESTUDIO ESTADÍSTICO:.....	117
4.11.1	Estadístico de la Chi-cuadrado.....	117
4.11.2	Modelo de regresión logística multinomial.....	117
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>119</b>
5.1	Caracterizar los casos de HiperCKemia en función del perfil clínico. ...	121
5.2	Determinar la utilidad o rendimiento de las pruebas no invasivas previas a la biopsia muscular.....	124
5.3	Aportación del EMG y RM muscular en diagnóstico de las HCK.....	126
5.3.1	Estudio Electrofisiológico.....	126
5.3.2	Estudio imagen mediante RM muscular.....	128
5.4	Ver el rendimiento de la biopsia muscular, tanto en su perfil histológico como en estudios proteicos y enzimáticos.....	134
5.4.1	Estudio histopatológico.....	134
5.4.2	Estudio Proteico/Enzimático.....	136
5.5	Comprobar la aportación de los estudios genéticos tanto dirigidos como aplicando un paneles de genes específicos. ....	145
5.5.1	Estudio genético dirigido.....	145

5.5.2 *Panel de genes*.....146

5.6 Determinar evolución de las HCK .....149

5.7 Diseñar un algoritmo diagnóstico que sirva de guía de actuación en los  
diferentes estratos asistenciales.....152

5.7.1 *Diagnósticos* .....152

5.7.2 *Modelo estudio y Algoritmo diagnóstico* .....155

**6 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES ..... 159**

6.1 DISCUSION .....161

6.2 CONCLUSIONES.....171

6.3 CONCLUSIONS.....175

**7 BIBLIOGRAFÍA..... 179**

**8 ANEXOS..... 193**

## **ABREVIATURAS**

CK - Creatin Kinasa

HCK - HiperCKemia

LSN - Valores límite de normalidad

NA - Neuroacantocitosis

CAC - Corea-acantocitosis autosómica recesiva

SML - Síndrome de de McLeod

HM - Hipertermia Maligna

LGMD - Distrofia muscular de cinturas

EMG - Electromiografía

HCK - HiperCKemia

ADN - Ácido desoxirribonucleico

MLPA - Multiplex ligation-dependent probe amplification

UV - UltraVioleta

NADPH - Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato

DBS - Dried blood spot

GAA - Alfa glucosidasa ácida

4-MUG - 4 metilumbeliferil-alfa-D-glucopiranosido

EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético

PUAM - Potenciales de acción de unidad motora

TAC - Tomografía axial computarizada

RM - Resonancia Magnética

HE - Hematoxilina & Eosina

TME - Tricromico Modificado de Engel

ORO - Oil Red O

PAS - Periodic acid–Schiff stain

NADH-TR - NADH-tetrazolium reductase

SDH - Succinate Dehydrogenase

COX - Cytochrome oxidase

MAD - Mioadenilato desaminasa

ATPasa - Adenosine triphosphatase

IgG - Inmunoglobulina G

SDS - Sodium dodecyl sulfate

KDa - KiloDalton

MHC - Complejo mayor de histocompatibilidad

TBS - Tris-buffered saline

BCIP/NBT - Bromocloroindolil fosfato / nitroblue tetrazolium

CoQ1 - Coenzima Q1

NaN<sub>3</sub> - Azida de sodio

BSA - Bovine serum albumin

KCN - Cianuro de potasio

DBH2 - Decilubiquinol

DB - Decilubiquinona

Abs - Absorbancia

DTNB - 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)

HCl - Ácido clorhídrico

RNA - Ácido ribonucleico

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa

cDNA - ADN complementario

RT-PCR - Reverse transcription polymerase chain reaction

OD - Densidad Óptica

dNTP - Deoxynucleotide

LGMD2A - Distrofia muscular de cinturas 2A / Calpainopatía

LGMD2B - Distrofia muscular de cinturas 2B / Disferlinopatía

LGMD1B - Distrofia muscular de cinturas 1B / Laminopatía

LGMD2I - Distrofia muscular de cinturas 2I / FKRP  
LGMD2L - Distrofia muscular de cinturas 2L / ANO5  
LGMD2G- Distrofia muscular de cinturas 2G / TCAP  
DMD - Distrofia Muscular Duchenne  
CR - Cadena Respiratoria  
CPTII - Carnitine palmitoyltransferase 2  
ELA - Esclerosis lateral amiotrófica  
CMT - Charcot-Marie-Tooth  
DM1 - Distrofia miotónica tipo 1  
AF - Antecedentes Familiares  
EST - Estatinas  
Kb - Kilo base  
gl - Grados de libertad  
mM – Mili molar  
H2O<sub>d</sub> - Agua destilada  
CaCl<sub>2</sub> - Cloruro de calcio  
pH - Potencial de hidrógeno  
ATP - Adenosín trifosfato  
KCl - Cloruro de potasio  
DAB - Diaminobencidina  
DTT - Dithiothreitol  
AMP - Adenosín monofosfato  
NaOH - Hidróxido de sodio  
PBS - Tampón fosfato salino  
TA - Temperatura ambiente  
Aprox - Aproximadamente  
RNase - Ribonucleasa



## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Porcentaje de individuos normales cuya actividad de CKs se sitúa por encima de los límites de la normalidad en diferentes puntos de corte. En paréntesis se expresan los valores de CKs para cada punto de corte.	<b>Pag. 51</b>
<b>Tabla 2.</b> HiperCKemia cuya causa no es neuromuscular.	<b>Pag. 53</b>
<b>Tabla 3.</b> Miopatías genéticas que se pueden presentar como hiperCKemia asintomática / paucisintomática.	<b>Pag. 55</b>
<b>Tabla 4.</b> HiperCKemia de origen neuromuscular no miopáticas:	<b>Pag. 58</b>
<b>Tabla 5.</b> Rendimiento diagnóstico en series de hiperCKaemia asintomática/paucisintomática más representativas.	<b>Pag. 60</b>
<b>Tabla 6.</b> Investigaciones mínimas en la biopsia muscular necesarias para estudiar la hiperCKemia.	<b>Pag. 66</b>
<b>Tabla 7.</b> Métodos de rutina para el análisis de biopsias musculares.	<b>Pag. 93</b>
<b>Tabla 8.</b> Anticuerpos monoclonales utilizados en inmunohistoquímica (IHQ) e inmunotransferencia (ITF).	<b>Pag. 100</b>
<b>Tabla 9.</b> Cuestionario al microscopio óptico previo a decisión de estudio de microscopia electrónica.	<b>Pag. 104</b>
<b>Tabla 10.</b> Características y genes incluidos en el panel de genes.	<b>Pag. 113</b>
<b>Tabla 11.</b> Características de los pacientes estudiados.	<b>Pag. 123</b>
<b>Tabla 12 (a y b).</b> Resultados pruebas no invasivas.	<b>Pag. 124</b>
<b>Tabla 13.</b> Resultados EMG vs diagnóstico.	<b>Pag. 126</b>
<b>Tabla 14.</b> Análisis contingencia para estudiar la asociación entre alcanzar un diagnóstico y las alteraciones en el EMG. Valores observados y valores esperados (entre paréntesis) si los factores fuesen independientes y valor chi-cuadrado.	<b>Pag. 127</b>
<b>Tabla 15.</b> Resultados RM muscular vs diagnóstico.	<b>Pag. 128</b>



<b>Tabla 16.</b> Análisis de contingencia para estudiar la asociación entre alcanzar un diagnóstico y las alteraciones en la RM. Valores observados y valores esperados (entre paréntesis) si los factores fuesen independientes y valor chi-cuadrado.	<b>Pag. 129</b>
<b>Tabla 17.</b> Análisis de contingencia para estudiar la asociación entre años de evolución y la gravedad de la RM. Valores observados y valores esperados (entre paréntesis) si los factores fuesen independientes y valor chi-cuadrado.	<b>Pag. 132</b>
<b>Tabla 18.</b> Hallazgos histopatológicos, en Tricrómico de Engel, en enzimas oxidativos (SDH, NADH-TR y COX) y miofosforilasa.	<b>Pag. 135</b>
<b>Tabla 19.</b> Estudio proteico frente al diagnóstico genético.	<b>Pag. 138</b>
<b>Tabla 20.</b> Mutaciones en los genes de estudios genéticos dirigidos.	<b>Pag. 145</b>
<b>Tabla 21.</b> Mutaciones detectadas en los diferentes genes del panel de genes.	<b>Pag. 147</b>
<b>Tabla 22.</b> Representación esquemática de la evolución sintomática de los pacientes.	<b>Pag. 151</b>
<b>Tabla 23.</b> Significación chi-cuadrado de la asociación entre niveles de CK y la probabilidad de alcanzar un diagnóstico.	<b>Pag. 153</b>
<b>Tabla 24.</b> Aportación al diagnóstico final del EMG, RM, biopsia muscular y panel de genes.	<b>Pag. 154</b>
<b>Tabla 25.</b> Relación diagnóstico final con el perfil clínico.	<b>Pag. 154</b>

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Esquema de la organización de la fibra muscular.	<b>Pag. 46</b>
<b>Fig. 2.</b> Representación tridimensional de la CK-3.	<b>Pag. 48</b>
<b>Fig. 3.</b> Proteínas implicadas en diferentes distrofias musculares.	<b>Pag. 54</b>
<b>Fig. 4.</b> Analizador Beckman Coulter.	<b>Pag. 81</b>
<b>Fig. 5.</b> Principio de la reacción para determinar la CK.	<b>Pag. 81</b>
<b>Fig. 6.</b> Toma de muestra para DBS de Pompe.	<b>Pag. 86</b>
<b>Fig. 7.</b> Patrones de EMG.	<b>Pag. 88</b>
<b>Fig. 8.</b> Toma de biopsia muscular.	<b>Pag. 91</b>
<b>Fig. 9.</b> Inmunohistoquímica.	<b>Pag. 98</b>
<b>Fig. 10.</b> Inmunofluorescencia indirecta.	<b>Pag. 98</b>
<b>Fig. 11.</b> Marcaje doble en inmunofluorescencia.	<b>Pag. 99</b>
<b>Fig. 12.</b> Ion Torrent y chip.	<b>Pag. 115</b>
<b>Fig. 13.</b> Esquema del proceso para secuenciación con Ion Torrent.	<b>Pag. 116</b>
<b>Fig. 14.</b> a) La frecuencia de la participación de los músculos individuales entre todos los pacientes, b) entre LGMD, c) entre distrofinopatías y d) glucogenosis. Columnas azules: no afectado; Columnas rojas: afectados con la puntuación de 1 a 2; Columnas verdes: afectada con puntuación de 3.	<b>Pag. 130-131</b>
<b>Fig. 15.</b> Representación de cómo son los hallazgos en la RM antes y después de 5 años en los pacientes que desarrollan debilidad.	<b>Pag. 133</b>
<b>Fig. 16.</b> Resultados de las biopsias.	<b>Pag. 134</b>
<b>Fig. 17.</b> Tinciones histopatológicas de rutina.	<b>Pag. 137</b>

<b>Fig. 18.</b> Representación de los déficits de calpaina y su relación secundaria a otras proteínas.	<b>Pag. 139</b>
<b>Fig. 19.</b> a) Inmunohistoquímicas: (A) espectrina (control), (B) alfa-sarcoglicano, (C) beta-sarcoglicano, (D, E y F) distrofina, (G y H) disferlina, (I) caveolina3, (J) emerina y (K) alfa-distroglicano. b) Inmunotransferencias: (A y E) distrofina 1, (B) distrofina 2, (C) distrofina 3, (D y F) disferlina, (G) calpaína 2C4, (H) calpaína 12A2, (I) merosina, (J) Lamina A/C, (K) alfa-sarcoglicano, (L) beta-sarcoglicano, (M) emerina y (N y O) caveolina. Las flechas rojas ausencia o reducción comparado con los controles.	<b>Pag. 140-141</b>
<b>Fig. 20.</b> Comparación del estudio de caveolina-3 mediante las tres técnicas analizadas. La flecha roja indica ligera disminución de proteína.	<b>Pag. 142</b>
<b>Fig. 21.</b> Inmunotransferencia: (A) calpaína 12A2, (B) calpaína 2C4. Las flechas azules indican disminución de proteína y las rojas ausencia comparado con los controles.	<b>Pag. 142</b>
<b>Fig. 22.</b> Estudio de marcadores inflamatorios en las biopsias con infiltrados. (A) CD68, (B) CD4, (C) C5b9, (D) CD8.	<b>Pag. 143</b>
<b>Fig. 23.</b> Representación esquemática en números absolutos de los diferentes niveles de estudio de las anomalías mitocondriales.	<b>Pag. 144</b>
<b>Fig. 24.</b> Diagnósticos alcanzados con el panel de genes.	<b>Pag. 146</b>
<b>Fig. 25.</b> Representación de los diagnósticos alcanzados con el método clásico vs uso panel genes.	<b>Pag. 148</b>
<b>Fig. 26.</b> Proporción de LGMD que evolucionan con debilidad.	<b>Pag. 150</b>

<b>Fig. 27.</b> Proporción de otros diagnósticos desarrollan debilidad.	<b>Pag. 151</b>
<b>Fig. 28.</b> Distribución de los diagnósticos en la serie de HCK.	<b>Pag. 152</b>
<b>Fig. 29.</b> Representación gráfica de los factores incluidos en el modelo de regresión logística para llegar a un diagnóstico.	<b>Pag. 156</b>
<b>Fig. 30.</b> Nomograma del modelo de regresión logística propuesto.	<b>Pag. 156</b>
<b>Fig. 31.</b> Algoritmo diagnóstico propuesto para las HCK.	<b>Pag. 157</b>



## **1. INTRODUCCIÓN**



## **1.1 EL MÚSCULO**

### *"BASES CELULARES Y MOLECULARES DEL MÚSCULO"*

#### **1.1.1 BIOLOGÍA CELULAR**

El músculo es un tipo de tejido que tiene a su cargo el movimiento del cuerpo y de sus partes y el cambio de tamaño y forma de los órganos internos. El músculo se divide en fascículos y éstos a su vez en fibras. Los músculos están constituidos por un variado número de fibras y, cada una de estas fibras es una célula. Éstas son alargadas y tienen forma de huso.

La unidad básica de todo músculo es la miofibrilla, estructura filiforme muy pequeña formada por proteínas complejas. Cada célula muscular o fibra contiene varias miofibrillas, compuestas de miofilamentos de dos tipos, gruesos y delgados (finos), que adoptan una disposición regular. Estas miofibrillas se extienden a todo lo largo de la célula muscular.



Por la disposición física de las fibras musculares, respuestas a diferentes estímulos, características de su innervación y la función, el músculo se halla dividido en dos tipos básicamente los cuales son el Músculo Estriado y el Músculo Liso. En el músculo estriado existe una especialización de éste que es el Músculo Cardíaco, el cual es propio del miocardio y, el otro para diferenciarlo se le llama esquelético. A su vez el músculo liso se halla dividido en dos tipos que son el músculo liso multiunitario y unitario (o de unidad única). Aproximadamente el 40% del cuerpo humano está conformado por músculo estriado esquelético y el 10% por músculo liso y cardíaco.

En la célula muscular algunas de las partes que la constituyen cambian su nombre, así pues su membrana se le denomina Sarcolema, su citoplasma es Sarcoplasma, las mitocondrias se les llama Sarcosomas y al Retículo Endoplasmático Liso se le conoce como Retículo Sarcoplásmico. El prefijo Sarco viene del griego Sarcos (σάρκο) que significa Carne.

## **1.1.2 BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **1.1.2.1 Proteínas Contráctiles**

Son las que generan la fuerza durante la contracción, las constituyen los filamentos gruesos (MIOSINA II) y los delgados (ACTINA).

### **1.1.2.2 Proteínas Reguladoras**

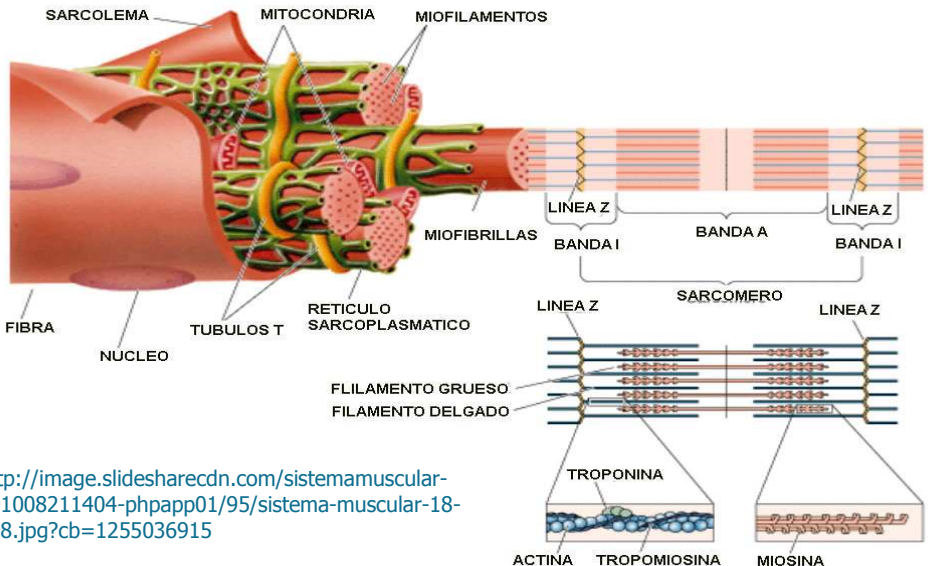
Son la tropomiosina y troponina. La TROPOMIOSINA forma parte de los filamentos delgados y su función es bloquear los sitios de unión de miosina de la actina en el momento en que el músculo está «relajado». Por su parte la TROPONINA también forma parte de los filamentos delgados pero se encarga de mantener en su posición a la tropomiosina.

### **1.1.2.3 Proteínas Accesorias o Estructurales**

Tienen por función contribuir a la estabilidad, alineación, elasticidad y extensibilidad de las miofibrillas. Son más de 12 proteínas diferentes (nebulina, titina, distrofina,...).

La organización de la fibra muscular la podemos ver esquematizada en la figura 1.

## ORGANIZACIÓN DE LA FIBRA MUSCULAR



<http://image.slidesharecdn.com/sistemamuscular-091008211404-phpapp01/95/sistema-muscular-18-728.jpg?cb=1255036915>

**Figura 1: Esquema de la organización de la fibra muscular.**

### 1.1.3 ENZIMAS Y MUSCULO ESQUELETICO

El uso diagnóstico de los niveles séricos de enzimas sarcoplásmicas se remonta a 1953, cuando Schapira y sus colegas reportaron altos niveles de aldolasa en suero en pacientes con distrofia muscular (Schapira et al. 1953). Esto fue confirmado luego en muchos laboratorios (Rowland y Ross 1958) y se extendió a fosfohexosa isomerasa y otras enzimas solubles (Rowland et al. 1960). En 1958, Setsuro Ebashi, entonces uno de los bioquímicos del músculo líder en el mundo, introdujo el uso de la creatin Kinasa (CK), como la enzima más específica del músculo, y se convirtió rápidamente en la medida de rutina de la enfermedad del muscular (Ozawa et al 1959).

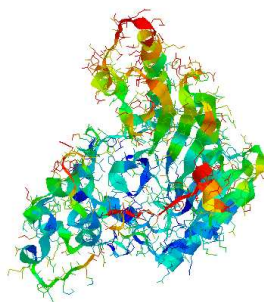
Hoy en día la determinación de los niveles de la enzima Creatin-Kinasa en suero sanguíneo es la prueba bioquímica más se utiliza como indicador de una miopatía. Generalmente una hiperCKemia (HCK) suele presentarse junto a otras manifestaciones miopáticas y se emplea como test de apoyo al diagnóstico. En ocasiones se usa como simple método de cribaje (por ejemplo, en la detección de portadoras de distrofinopatía), e incluso alguna vez se emplea como marcador de actividad en el seguimiento de miopatías inflamatorias. Por otro lado, va apareciendo un creciente número de sujetos a los que como consecuencia de un análisis de rutina, o a través de estudios por otras afecciones, o en relación con la prescripción de estatinas se les detecta casualmente un aumento de la Creatin-Kinasa sérica. A menudo a estos pacientes se les remite a las consultas de patología neuromuscular con el fin de descartar una miopatía subyacente, muchas veces ya con la solicitud expresa de una biopsia muscular.

## 1.2 LA CREATIN-KINASA

La CK es una enzima dimérica fundamental para el metabolismo energético de las células (Fig. 2). La combinación de los monómeros M (Muscle) y B (Brain) genera tres tipos de isoenzimas: CK-1 (BB), CK-2 (MB) y CK-3 (MM).

### Representación tridimensional de la CK-3

[https://i2.wp.com/upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/41/Creatine\\_kinase.PNG](https://i2.wp.com/upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/41/Creatine_kinase.PNG)



**Figura 2. Representación tridimensional de la CK-3.**

La principal proporción de la actividad total de la CK se encuentra en el músculo esquelético y está predominantemente en la isoforma CK-3. Otros tejidos con unos niveles de CK relativamente elevados son el miocardio, en el que aproximadamente el 40% es la isoforma CK-2, el tracto gastrointestinal, el pulmón y el cerebro, en el que predomina la isoforma CK-1.

Los niveles sanguíneos de CK, provienen mayoritariamente de la isoenzima MM del músculo esquelético, lo que se explica fundamentalmente por el predominio de masa muscular esquelética respecto al músculo cardiaco, además de que la vida media de las isoenzimas MB y BB es más corta.

### 1.3 HIPERCKEMIAS

El termino hiperCKemia asintomática se emplea cuando la elevación persistente de CKs no se asocia a manifestaciones clínicas. HiperCKemia paucisintomática se aplica cuando la elevación de CKs se acompaña de manifestaciones banales como mialgias, calambres o fatiga y están ausentes síntomas capitales como debilidad muscular, atrofia muscular o miotonía. El término hiperCKemia idiopática propuesto por Rowland (Rowland et al. 1980) se restringe para aquellos casos de HiperCKemia asintomática o paucisintomática en los que no se encuentra una causa tras realizar exámenes neurológicos, electrofisiológicos e histológicos, bioquímicos y moleculares al uso.

#### 1.3.1 Niveles sanguíneos de CK en condiciones fisiológicas:

El límite entre la normalidad y valores patológicos de la CK a menudo están borrosos ya que su concentración sanguínea depende de numerosos factores (Brewster LM et al. 2007; Neal RC et al. 2009):

- Género: Las mujeres muestran niveles de CK más bajos que los hombres , (Neal RC et al. 2009).
- Etnia: Los negros afro-caribeño presentan niveles de CK muy superiores a los caucásicos (Sherwood RA et al. 1996; Apple FS et al. 2003; Brewster LM et al. 2007). Los asiáticos también muestran también cifras más elevadas, aunque no tan altas como las de los

negros (Sherwood RA et al. 1996; Sundaram M et al. 2008; Neal RC et al. 2009).

- Edad: Los cambios con la edad son pequeños y su efecto se puede ignorar si se excluye la edad pediátrica. La CK en los hombres tiende a disminuir con la edad (Neal RC et al. 2009), quizá reflejando el descenso de la masa muscular. Las mujeres en edad adulta la mantiene estable hasta los 40 años, y luego muestra una declinación (Lane RJ and Roses AD. 1981).
- Ejercicio: aumenta la actividad de la CK, debido a los daños sarcoméricos que se producen, por ello el aumento de CK está directamente relacionado con la intensidad y la forma del ejercicio (Brancaccio P et al. 2007). Los mayores incrementos aparecen tras una actividad intensa y sostenida como la maratón, o tras actividades que incluyen las contracciones excéntricas como el levantamiento de pesas.

Tras el ejercicio los niveles de CK alcanzan un máximo en 24 horas y luego disminuyen lentamente en el curso de varios días. Por tanto, la muestra de sangre debe tomarse en reposo y pasado un mínimo de tres días después de practicar cualquier forma de ejercicio con intensidad significativa.

### 1.3.2 Valores límite de normalidad (LSN) de la CKs:

Frente a los valores límite que proponen los ensayos de CK en los kits comerciales, se impone el empleo de valores basados en una muestra poblacional que tiene en cuenta las variaciones arriba señaladas.

Si se toma cifra de 1,5 veces el LSN como el punto de corte, frente al convencional LSN correspondiente al percentil 97,5, se reduciría aproximadamente hasta la mitad del número de personas que precisan ser investigadas, a cambio solamente de una pequeña merma de sensibilidad (Kyriakides et al, 2010). La tabla 1 ilustra ejemplos de valores de CK para distintos puntos de corte y el porcentaje de población normal que darían un falso positivo, y por tanto serían estudiadas de forma innecesaria.

**Tabla 1. Porcentaje de individuos normales cuya actividad de CKs se sitúa por encima de los límites de normalidad en diferentes puntos de corte (1.0 LSN corresponde al percentil 97.5). En paréntesis se expresan los valores de CKs para cada punto de corte (Brewster et al. 2007).**

	<b>Blancos mujeres</b>	<b>Blancos hombres</b>	<b>Negros mujeres</b>	<b>Negros hombres</b>
<b>1.0 LSN</b>	2.5 (217)	2.5 (336)	2.5 (414)	2.58 (801)
<b>1.5 LSN</b>	1.5 (325)	1.0 (504)	1.3 (621)	0.5 (1201)
<b>2.0 LSN</b>	0.2 (434)	0.8 (676)	0.5 (828)	0.0 (1602)



### 1.3.3 HiperCKemias secundarias:

Los procesos que ocasionan una elevación de la CK han sido revisados detalladamente por Morandi (Morandi et al. 2006). Sucintamente quedan agrupados en las siguientes categorías (Tabla 2):

- a) Enfermedades sistémicas: sobre todo las enfermedades del tejido conectivo, desequilibrio hidroelectrolítico, insuficiencia renal o cardíaca, infecciones virales (influenza, virus coxsackie, adenovirus), la acantocitosis, el cáncer de próstata avanzado y la enfermedad celiaca.
- b) Traumas y agresiones al tejido muscular: Incluyendo fiebre alta con escalofríos, ataques epilépticos, distonía grave e inyecciones intramusculares.
- c) Afecciones endocrinológicas: El hipotiroidismo es una causa frecuente de hiperCKemia (57% de pacientes con hipotiroidismo y 10% de hipotiroideos subclínicos), siendo el nivel promedio de CK de 700 U/L. Con tratamiento hormonal se normalizan los niveles de CK (Hekimsoy Z et al. 2005). El hipoparatiroidismo cursa también con niveles elevados de CK, incluso sin síntomas de debilidad muscular y con biopsia muscular normal (Shane E et al. 1980).
- d) Tóxicos y drogas: alcohol, cocaína, heroína

e) Fármacos: En un estudio prospectivo con fármacos apareció hiperCKemia en el siguiente orden de frecuencia: estatinas (46.4%), fibratos (14.3%), antirretrovirales (14.3%), antagonistas del receptor angiotensina-II (10.7%), inmunosupresores (7.1%) e hidroxicloroquina (7.1%). A esta lista hay que añadir la clozapina o beta-bloqueantes como el pindolol.

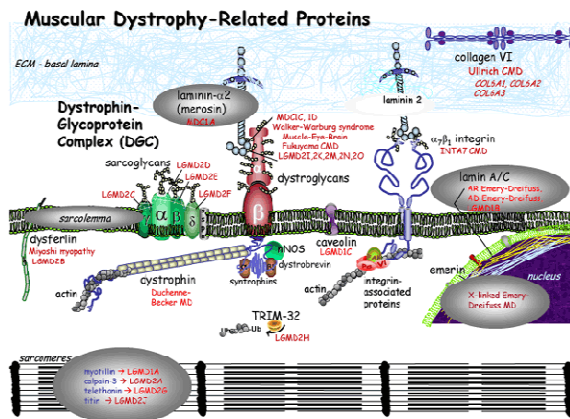
**Las Estatinas** pueden desencadenar una miopatía cuya manifestación clínica habitual son mialgias asociadas o no a la hiperCKemia. Estos síntomas generalmente remiten tras la suspensión de la medicación. Sin embargo un porcentaje de pacientes, todavía desconocido, continúan con niveles elevados de CK tras dicha suspensión, y se ha pensado que en estos casos las estatinas pueden haber causado un trastorno metabólico permanente en el músculo, o haber desarrollado una miopatía inflamatoria crónica, o bien que se trate simplemente de una comorbilidad casual; este tema aún no está cerrado.

**Tabla 2. HiperCKemia cuya causa no es neuromuscular**

Medicamentos
Ejercicio muscular intenso (especialmente excéntrica)
Trauma (electromiograma, estudios de inyecciones IM)
Cirugía
Tóxicos y drogas (alcohol, heroína, cocaína)
Endocrinológicas (hipotiroidismo, hipoparatiroidismo)
Enfermedades virales
Metabólicos (hipopotasemia, hiponatremia)
La enfermedad crónica cardíaca (CK-MB)
Idiopática (esporádico y familiar)
Apnea obstructiva del sueño
Macro-CK

### 1.3.4 HiperCKemia como expresión de una miopatía

Tradicionalmente era bien conocida la existencia de mujeres portadoras de distrofinopatías mostrando cifras elevadas de CK, las cuales en la biopsia muscular expresan un déficit parcheado de distrofina a modo de mosaicismo (Hoffman EP et al. 1996). Luego, se han ido describiendo casos relacionados con otros tipos de miopatías (Fig. 3) como pacientes asintomáticos o en estadios presintomáticos de miopatías distales no caracterizadas (Galassi G et al. 1987), desminopatías (Prelle A et al. 1996), sarcoglicanopatías (Angelini 1998), en familias con déficit de caveolina (Carbone I et al. 2000; Alias L et al. 2004; Papadopoulos et al. 2015), déficits de Fukutina (Boito, 2005; Fiorillo et al. 2013), enfermedad de Danon (Musumeci O et al. 2005), disferlinopatías (Chiba et al. 2003; Fernández C et al. 2006), calpainopatías (Hanisch F et al. 2007) y ANO5 (Milone et al 2012; Penttilä S et al, 2012; Schessl J et al 2012), ver la tabla 3.



[www.healthcare.uiowa.edu/uidl/muscular\\_dystrophy/images/SM-650.gif](http://www.healthcare.uiowa.edu/uidl/muscular_dystrophy/images/SM-650.gif)

**Figura 3. Proteínas implicadas en diferentes distrofias musculares.**

**Tabla 3. Miopatías genéticas que se pueden presentar como hiperCKemia asintomática / paucisintomática**

1. Distrofias musculares
  - a) Caveolinopatía
  - b) Calpainopatía
  - c) Desminopatía
  - d) Disferlinopatía (LGMD2B y Miyoshi)
  - e) Proteína relacionada con la Fukutina (FKRP) LGMD 2I
  - f) Distrofinopatía (incluyendo mujeres portadoras)
  - g) Sarcoglicanopatías
2. Miopatías Metabólicas
  - a) Glucogenosis
    - Glucogenosis tipo II (déficit de maltasa ácida ) del adulto
    - Glucogenosis tipo V (déficit de miofosforilasa)
  - b) Lisosomiales
    - Lamp 2
  - c) Mitocondriales
  - d) Lipídicas
3. Canalopatías
  - a) La DM tipo 2
  - b) Ryanodina (RYR1)
4. Miopatías Miofibrilares

### **1.3.5 HiperCKemia en enfermedades neuromusculares no miopáticas**

#### **1.3.5.1 Procesos Neurógenos**

Niveles elevados de CK pueden aparecer en procesos neurógenos agudos como síndrome de Guillain-Barré o poliomedlitis aguda. En estas patologías, generalmente la elevación de CK neurógenas no sobrepasa 5 veces el valor normal y suelen ser pasajeros.

En cambio, en enfermedades neurógenas crónicas como la atrofia bulboespinal o enfermedad de Kennedy, la atrofia muscular espinal III, el síndrome postpolio, o neuropatías crónicas tanto genéticas tipo Carcot-Marie-Tooth, así como formas adquiridas tipo CIDP las elevaciones de CKs pueden llegar a superar en 10 veces el valor normal (Ropper A et al. 1984).

En estos casos no está claramente establecido el mecanismo por el cual se eleva la CK, pero se ha postulado que puede deberse al daño muscular producto del esfuerzo físico que intenta compensar la debilidad muscular existente (Rudnick-Schoneborn S et al. 1998).

#### **1.3.5.2 Neuroacantocitosis (NA)**

HiperCKemia está presente en la mayoría de los pacientes con cualquiera de los síndromes de NA (Walker RH et al. 2007): corea-acantocitosis autosómica recesiva (CAC), o la forma ligada al cromosoma X, también denominada síndrome de de McLeod (SML). En ambos trastornos, puede haber indicios de miopatía tanto en el EMG como neuropatológicos (atrofia de fibras tipo 2). La edad de aparición de la corea en la CAC va desde

los adolescentes hasta la séptima década, presentándose en la mayoría casos a los 30 años. En la SML, la edad de inicio de la corea oscila entre los años 20 a 60. Las alteraciones cognitivas y psiquiátricas también son típicos y el diagnóstico puede retrasarse hasta que se desarrolla el trastorno del movimiento. El diagnóstico puede ser enmascarado por el uso de neurolépticos, y demás, la presencia de miopatía puede predisponer al síndrome neuroléptico maligno

### **1.3.5.3 Hipertermia Maligna**

Es una afección hereditaria que puede ser mortal y que se caracteriza por una reacción muscular aguda tras la exposición a anestésicos volátiles o relajantes musculares despolarizantes. Su incidencia no está definida. No todos los sujetos susceptibles pueden desencadenar la crisis; y a la inversa, una persona en riesgo y asintomática tras una exposición no está exenta de sufrir un ataque posterior. Entre sus causas están las mutaciones del gen de la Ryanodina (RYR I) (Fiege et al 2002), que a la vez se pueden expresar como una miopatía Central Core, Distrofia Muscular Congenita o HiperCKemia asintomática. Existen otros genes implicados (Malandrini 2008). La HiperCKemia asintomáticas se viene considerando como un riesgo potencial de HM (Paasuke 1986), pero hay sujetos sensibles a HM que pueden tener una CK normal. En la actualidad el único procedimiento seguro para identificar la HM es practicar un test de sensibilidad in vitro.

En la tabla 4 podemos ver resumidas las HCK de origen neuromuscular.

**Tabla 4. HiperCKemia de origen neuromuscular no miopática:****1. Afecciones Neurógenas:**

- Esclerosis lateral Amiotrófica
- Atrofia Muscular Espinal Hereditaria tipo III and IV,
- Síndrome post-polio
- Atrofia muscular bulboespinal
- Neuropatías: CMT y CIDP

**2. Neuroacantocitosis****3. Hipertermia Maligna****1.3.6 Estudios específicos sobre hiperCKemias asintomática / paucisintomática**

No se ha establecido un protocolo estandarizado que aborde el diagnóstico de las enfermedades neuromusculares que cursan con hiperCKemia, sobre todo porque son escasos las series con un número significativo de pacientes. Además, en general, las cohortes son retrospectivas y la metodología aplicada, sobre todo las técnicas empleadas para el estudio de la biopsia muscular no son equiparable.

Las publicaciones pioneros hacían hincapié en que podía encontrarse alteraciones en el EMG y en la biopsia muscular hasta en un 70 % de casos, aunque los hallazgos resultaban la mayoritariamente inespecíficos (Sunohara N et al. 1984; Brewster LM and de Visser M. 1988; Kleppe B et al. 1995; Reijneveld JC et al. 2001; Joy JL and Oh SJ. 1989); incluso se llegó a postular que si la biopsia muscular descartaba signos inmuno-histoquímicos de

distrofinopatía no merecía la pena profundizar con otras pruebas o realizar un seguimiento a largo plazo debido a que no suelen aparecer complicaciones.

En la tabla 5 se expone una síntesis de los rendimientos de la biopsia muscular en las series mas extensas de hiperCKemia asintomática. Globalmente se alcanza un diagnóstico específico en la cuarta parte (26 %) de los casos estudiados, existen alteraciones miopáticas inespecíficas (40%) o neurógenas (5%) en la mitad, y el resultado es normal en alrededor de un tercio (29%).

Si analizamos más detalladamente las series más significativas que se han publicado en los últimos diez años, observamos: Prella A et al. (2002), publicaron un estudio retrospectivo de 114 pacientes con una sistemática bastante exhaustiva para la época, concluyendo que hasta un 20% de los casos podrían diagnosticarse de forma segura o probable y otro 50% de los pacientes manifestaban anomalías en la biopsia muscular cuyo alcance y naturaleza no se podía precisar. Otra serie posterior de Fernández C (Fernández C et al. 2006), analizan 104 casos de hiperCKemia con cifras superiores a 500 UI/L y realizan un exhaustivo análisis patológico e inmunohistoquímico, llegando a identificar el diagnóstico de hasta un 50% de los casos; entre ellos se observaron un número no desdeñable de enfermedades tratables como polimiositis o déficit de maltasa ácida del adulto, y con importantes repercusiones para la prevención, como es el caso de las portadoras de distrofinopatía. Fanin M (Fanin M et al. 2009), estudian 204 casos de hiperCKemia asintomática con cifras superiores a 500 UI/L mediante análisis proteico y genético- molecular; concluyeron, dejando aparte



las distrofinopatías que al menos el 14% de los pacientes padecen diversas formas de distrofia muscular de cinturas (LGMD).

**Tabla 5. Rendimiento diagnóstico en series de hiperCKaemia asintomática/paucisintomática más representativas**

	<b>Miopático (Específico)</b>	<b>Miopático (Inespecífico)</b>	<b>Neurogeno</b>	<b>Normal</b>
<b>Joy et al. 1989</b>	12/19	3/19		4/19
<b>Reijnveld et al 2001</b>	6/37	24/37		7/37
<b>Prelle et al. 2002</b>	21/114	18/114	13/114	62/114
<b>Simmons et al. 2003</b>	6/20	3/20		11/20
<b>Fernandez et al., 2006</b>	55/105	26/104	2/104	15/104
<b>Dabby et al. 2006</b>	3/40	19/40	18/40	18/40
<b>Filosto et al., 2007</b>	15/105	68/105	8/105	14/105
<b>Malandrini et al. 2008</b>	3/37	29/37	2/37	3/37
<b>Total</b>	121/460	190/460	25/460	134/460
<b>( %)</b>	<b>26</b>	<b>40</b>	<b>5</b>	<b>29</b>

A la luz de los últimos estudios está claro que el rendimiento diagnóstico de la hiperCKemia va a depender, por una parte de los criterios de selección y por otro lado de la calidad y profundidad de las técnicas empleadas, particularmente en la biopsia muscular. Dada la complejidad y la limitada disponibilidad de muchas de estas técnicas, se recomienda el abordaje diagnóstico basado en un algoritmo.

### **1.3.7 Variables que predicen una biopsia muscular resolutive**

Solamente unos pocos estudios han intentado analizar variables clínicas con capacidad de predicción del rendimiento de la biopsia, destacando los siguientes indicadores:

#### **1.3.7.1 Nivel de hiperCKemia**

Una CK superando 10 veces la normalidad se ha asociado significativamente a una mayor probabilidad de llegar a un diagnóstico específico (Fernández et al 2006)]. De manera similar, una CK > 5 veces combinada con una edad inferior a 24 años tenían valor predictivo (Prelle et al 2002). En la serie de Filosto (Filosto et al. 2007) todos los casos que detectó con un déficit de la vía glucolítica terminal (particularmente déficit de miofosforilasa o glucogenosis tipo V) cursaban con CK superior a 7 veces el límite normal.

#### **1.3.7.2 Papel de la electromiografía**

Salvo raras ocasiones, como presencia de miotonía o un patrón neurógeno, la electromiografía (EMG) no suele proporcionar una orientación sólida al diagnóstico específico de hiperCKemia pauci o asintomática. Sin embargo algunos han sugerido que un EMG anormal aumenta la probabilidad de que la biopsia resulte patológica y por tanto podría usarse como criterio de selección. Por ejemplo, en una serie de Joy y Oh (Joy y Oh, 1998) la sensibilidad del EMG anormal respecto a la biopsia fue del 92% y su especificidad 100%, siendo su valor predictivo positivo del 100%, y el valor

predictivo negativo del 80%. Estas cifras han sido muy criticadas puesto que se basaban en una muestra pequeña y con estudios de biopsia muscular limitados. Más realistas son las cifras del grupo de Prelle (Prelle et al. 2002) sobre 100 casos con EMG y biopsia. La sensibilidad del EMG anormal respecto a la biopsia fue de 73%, pero la especificidad fue de sólo el 53%.; el valor predictivo positivo de un EMG anormal resultó de 51%, mientras que el valor predictivo negativo arroja el 74%.

En cualquier caso hay que destacar que los dos estudios señalados concuerdan en el alto valor predictivo negativo de un EMG normal (74-80%), aunque su contribución final para ayudar a seleccionar pacientes para indicación de biopsia tendrá que valorarse en el contexto.

### **1.3.7.3 Parámetros clínicos**

Una edad inferior a 15 años se asocia con mayor probabilidad de llegar al diagnóstico específico (Fernández et al. 2006). Otras variables que se asociaron con mayor probabilidad, pero sin alcanzar significación estadística fueron: mujeres frente a varones (63% vs 51%) y pauci-sintomática versus asintomática (59% vs 50%). Entre los pacientes con hiperCKemia investigados por Filosto (Filosto et al. 2007) los seis casos con glucogenosis presentaban mialgias inducidas por el ejercicio y ningún paciente con dolor en reposo aislado tenía una miopatía metabólica.

### **1.3.8 El pronóstico en pacientes con hiperCKemia pauci o asintomática**

Prelle (Prelle et al. 2002) partiendo de una cohorte 93 pacientes publicó el seguimiento de 55 de ellos al cabo de 6 años. La mayoría de los pacientes (43/55 o el 78%) todavía tenía hiperCKemia persistente pero a un nivel inferior. La CK se normalizó en 12/55 (22%). El análisis estadístico reveló una correlación entre la normalización de CK con biopsia normal. Un paciente del total de 55 fue diagnosticado de distrofia muscular de cinturas y a una mujer resultó ser portadora de distrofinopatía. En conjunto, el pronóstico a largo plazo resultó favorable. Otro estudio anterior de una serie de 23 pacientes con hiperCKemia idiopática, cuyo seguimiento medio fue de 7,2 años, proporcionó un pronóstico benigno sin que ninguno de los pacientes presentara alteraciones a excepción de un caso que desarrolló una neuropatía axonal (Reijneveld JC et al, 2000). Los valores medios de CK no cambiaron de forma significativa durante todo el seguimiento.

### **1.3.9 Riesgo de hipertermia maligna (HM)**

A menudo se plantea la posibilidad de susceptibilidad a la HM en un individuo con hiperCKemia. La confirmación de susceptibilidad a la HM implicaría obtener una segunda biopsia y, además, pocos centros a escala mundial ofrecen la posibilidad de realizar esta prueba. El riesgo real de HM ante un caso aislado de hiperCKemia es poco conocido dada la escasez de estudios a gran escala. Weglinski (Weglinski et al. 1997) encontraron un test de contractura in vitro positivo en 24/49 casos (49%) de los pacientes con

hiperCKemia. En cambio, después Malandrini (Malandrini et al. 2008) solo encontraron un caso de 37 con susceptibilidad en el test in vitro. Dadas las dificultades e inconvenientes que acarrea el test de susceptibilidad se aconseja asesorar a los pacientes con hiperCKemia inexplicable que asuman que puede ser susceptible a la HM y que se apliquen las directrices establecidas en el caso de anestesia. Esta recomendación puede hacerse extensiva a otros miembros de la familia.

### **1.3.10 Recomendaciones para el estudio de la Hiper-CK-emia Asintomática y Paucisintomática del comité de expertos de la EFNS.**

Actualmente están vigentes las recomendaciones emanadas del consenso de un grupo de expertos europeos (Kyriakides et al. 2010). Dichas recomendaciones están basadas en la revisión número reducido de estudios de clase IV y como resultado dichas recomendaciones solo alcanzan el nivel C de fiabilidad. Comprenden los siguientes pasos:

1. HiperCKemia se define como CKs > 1,5 veces el LSN.
2. Se deben descartar todas las causas no neuromusculares y otros no miopáticos recogidas en las Tablas 3 y 4.
3. Se debe indagar los antecedentes familiares de enfermedad neuromuscular, de hiperCKemia o HM.

4. Antes de embarcarse en investigaciones laboriosos y costosas, se aconseja confirmar la hiperCKemia repitiendo el ensayo. Se debe evitar el ejercicio vigoroso durante 7 días antes de la extracción de sangre y analizar por lo menos dos muestras en el intervalo de 1 mes.
5. Si se confirma hiperCKemia hay que llevar a cabo un estudio EMG.
6. Hay indicación de realizar la biopsia muscular en un paciente con hiperCKemia si cumple uno o más de los siguientes requisitos:
  - i. Si el EMG es anormal (miopático)
  - ii. Si la CKs es  $>3$  veces el valor normal.
  - iii. Si la edad del paciente es inferior a 25 años.
  - iv. Si está inducida por el ejercicio, dolor o intolerancia al ejercicio.
  - v. En mujeres con una hiperCKemia  $< 3$  veces el valor normal ante la posibilidad de que sea portadora de una distrofinopatía. Sin embargo, antes de la biopsia, se debe llevar a cabo un análisis de ADN en sangre. Actualmente con la sonda MPLA se puede identificar al 70% de las portadoras.
7. En los hombres con hiperCKemia  $< 3$  veces el valor normal se puede ofrecer una biopsia si están seriamente preocupados o, alternativamente, puede ser objeto de seguimiento en la consulta de neurología.

8. La cantidad y el tipo de técnicas de diagnóstico que se analizan en la biopsia muscular puede variar de unos laboratorios a otros, pero necesariamente debe incluir la histología, histoquímica e inmunohistoquímica señaladas en la tabla (Tabla 6) Pueden ser necesarias investigaciones adicionales, como el Western Blot, estudios enzimáticos y el análisis de ADN mitocondrial. Se debe almacenar una muestra congelada en el momento de la biopsia para posibles estudios posteriores.

**Tabla 6. Investigaciones mínimas en la biopsia muscular necesarias para estudiar la hiperCKemia.**

**1. Histología e histoquímica:**

Hematoxilina y eosina, Tricrómico de Gomori modificado, tinción de grasas rojo Oro, ácido periódico de Schiff (PAS), Trifosfato de Adenosina (ATP) a pH 9.4, 4.2 y 4.6, Succinato Deshidrogenasa (SDH), NADH-dehidrogenasa (NADH-D), Citocromo C Oxidasa (COX), miofosforilasa y fosfatasa ácida

**2. Inmunohistoquímica:**

Distrofina, sarcoglicanos, disferlina, caveolina-3, MHC-I, alfa-distroglicano, lamina A/C y merosina.

**3. Inmunoblot:**

Calpaina-3 y selectivamente alguna señaladas en apartado 2

## **2 HIPÓTESIS**





La HiperCKemia asintomática o paucisintomática obedece a miopatías causadas por mutaciones en genes y en menor medida a otras causas y que se expresan principalmente como afecciones benignas o presintomáticas.



### **3 OBJETIVOS**



1. Caracterizar los casos de HiperCKemia en función del perfil clínico.
2. Determinar la utilidad o rendimiento de las pruebas no invasivas previas a la biopsia muscular.
3. Aportación del EMG y RM muscular en el diagnóstico de las HCK.
4. Ver el rendimiento de la biopsia muscular, tanto en su perfil histológico como en estudios proteicos y enzimáticos.
5. Comprobar la aportación de los estudios genéticos tanto dirigidos (déficit proteína / mutación) como aplicando un paneles de genes específicos.
6. Determinar evolución y pronóstico de las HCK.
7. Diseñar un algoritmo diagnóstico que sirva de guía de actuación en las diferentes etapas asistenciales.



## **4 MATERIAL Y MÉTODOS**





Se trata de un estudio transversal y de seguimiento, en el que se analizaron las valoraciones cuantitativas y cualitativas de una serie de parámetros relacionados con las hiperCKemias en un registro de pacientes.

El estudio clínico se efectuó en una consulta especializada de patología neuromuscular del Servicio de Neurología del “Hospital Universitario La Fe” de Valencia. Se han consultado las bases de datos de dicha consulta para extraer los casos de hiperCKemia que cumplieran los criterios de inclusión, posteriores al comienzo de este estudio. También se han incluido de forma consecutiva aquellos pacientes remitidos a la consulta, que cumplieran los criterios de selección, durante los años en los que se ha desarrollado este estudio.

El estudio aborda una parte retrospectiva, basada en el análisis de los datos disponibles de la casuística presente y otra prospectiva, de modo que de forma protocolizada se ha procedido a la reevaluación de los casos correspondientes de 1999 hasta 2008 ampliando y completando estudios, así como evaluación de nuevos casos correspondientes de 2008 a 2014.

El presente estudio ha sido aprobado por el Comité Ético del Hospital Universitario La Fe de Valencia y autorizado por la Fundación para la Investigación del Hospital Universitario La Fe (Anexo I).

Se ha elaborado un protocolo de recogida de datos de los sujetos sometidos a estudio (Anexo II) y otro para la recogida de datos del estudio patológico de la biopsia muscular (Anexo III y IV). En los anexos del V al VIII se recogen los modelos de Consentimiento Informado para la biopsia muscular y estudio genético.

#### 4.1 PACIENTES

Se seleccionaron para el estudio 354 pacientes, biopsiados 300 de ellos entre los años 1999-2014, siguiendo los siguientes criterios:

- a) Elevación persistente de los niveles séricos de CK ( $CK > 1,5 \times UI/L$ ) en al menos dos determinaciones, sin que el paciente realizara ejercicio al menos una semana antes del examen.
- b) Pacientes asintomáticos o paucisintomáticos (mialgias, calambres, fatiga en grado menor).
- c) Ausencia de factores desencadenantes de hiperCKemia (medicamentos, endocrinopatía...).

A estos pacientes se les sometió al siguiente protocolo:

- Cuestionario estructurado (Antecedentes familiares, fármacos, síntomas) (Anexo III).
- Determinación de Creatin Kinasa.
- Exploración neurológica y valoración de la discapacidad funcional.
- Determinaciones bioquímicas/enzimáticas.
- Estudios electrofisiológicos.
- Morfología muscular: TAC o RM muscular.

- Estudio de Biopsia muscular.
  - Obtención de la muestra.
  - Histoquímica.
  - Inmunohistoquímica/Inmunofluorescencia.
  - Inmunotransferencia.
  - Microscopia electrónica, según casos.
  - Estudios enzimáticos
- Análisis genéticos.

## 4.2 DETERMINACIÓN DE CREATIN KINASA.

Se realizó una prueba UV cinética para cuantificar la Creatin Kinasa, (CK) del suero y plasma humanos, en analizadores Beckman Coulter (Fig. 4).

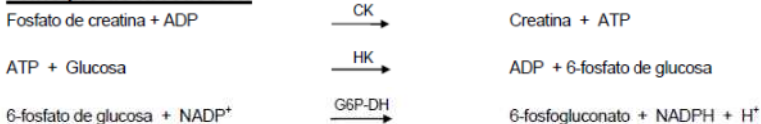


**Figura 4. Analizador Beckman Coulter**

El método está basado en las recomendaciones de la "Federación Internacional de Bioquímica Clínica" (IFCC), donde la tasa de aumento de la absorbencia, situada en 340/660 nm por causa de la formación de NADPH, es directamente proporcional a la actividad de la CK de la muestra. En la figura 5 podemos ver el principio en el que se basa la reacción.

En nuestro laboratorio el valor de normalidad de CK sérica está comprendido entre 0-145 UI/L en mujeres y entre 0-171 UI/L en hombres. Por lo que en nuestro caso seleccionamos pacientes con niveles de CK >250 (217,5 en mujeres y 256,5 en hombres).

### Principio de la reacción



**Figura 5. Principio de la reacción para determinar la CK.**

### 4.3 EXPLORACIÓN NEUROLÓGICA

La exploración neurológica se realizó en todos los sujetos del estudio, de forma protocolizada, evaluándose específicamente los siguientes ítems:

- Valoración de la debilidad muscular por grupos y gradación en base a la escala MRC, aplicándose la siguiente puntuación:
  - 0 Ausente: parálisis total.
  - 1 Mínima: contracción muscular visible sin movimiento
  - 2 Escasa: movimiento eliminada la gravedad.
  - 3 Regular: movimiento parcial sólo contra gravedad.
  - 4 Buena: movimiento completo contra gravedad y resistencia moderada.
  - 5 Normal: movimiento completo contra resistencia total.
- Exploración de los reflejos de estiramiento muscular.  
Se han explorado los reflejos mióticos bicipital, tricipital, estilo-radial, rotuliano y aquileo, de forma bilateral.
- Presencia de deformidades y retracciones articulares.
- Exploración de la sensibilidad.  
Se ha explorado tanto la sensibilidad superficial (tacto-algésica) como la profunda (vibratoria y posicional).
- Descripción del patrón de marcha.

#### 4.4 VALORACIÓN DE LA DISCAPACIDAD FUNCIONAL

- La escala de discapacidad modificada de Walton, Gardner y Medwin se ha adaptado para evaluar el grado de discapacidad funcional, empleándose la siguiente puntuación:

- 0: movilidad normal
- 1: leve alteración de la marcha
- 2: incapaz de correr
- 3: marcha dificultosa pero autónoma
- 4: uso de bastón para la deambulación
- 5: uso de muletas para la deambulación
- 6: deambula con andador
- 7: silla de ruedas
- 8: encamado

- Pruebas funcionales:

Para evaluar el seguimiento de los pacientes funcionalmente se realizan el test de 6MWT (McDonald et al. 2013) y la escala North Star (Mazzone E et al. 2009; Mazzone E et al. 2011; Mazzone E et al. 2013), estandarizados en la evaluación de los pacientes con distrofia muscular Duchenne (DMD), y puestos en marcha en la actualidad en la evolución de las enfermedades neuromusculares.



## **4.5 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS/ENZIMATICAS**

### **4.5.1 DETERMINACIONES ESTANDAR O DE RUTINA**

Se solicitan determinaciones de rutina en la primera visita para descartar causas secundarias de HCK, por ello se incluyen aquí determinaciones tales como la TSH, T3...

### **4.5.2 CURVA DEL ACIDO LÁCTICO**

El estudio de la curva del ácido láctico se restringió a los casos que presentaban mialgias-calambres e intolerancia con el ejercicio.

### **4.5.3 ACTIVIDAD ENZIMATICA DE ALFA GLUCOSIDASA ACIDA (GAA) PARA POMPE**

El análisis de la enzima GAA puede realizarse en muestras de sangre seca sobre papel filtro, la medición de la actividad de alfa glucosidasa acida con un mínimo de interferencia por otras alfa glucosidasas es realizado usando maltosa como inhibidor (Chamoles et al. 2004; Zhang et al. 2006), permitiendo así, un análisis rápido y sensible el cual ha sido desarrollado con la idea subyacente de implementarla en programas de screening en neonatos (Li et al. 2004).

El método para la valoración de GAA involucra un protocolo modificado a partir del ensayo de Chamoles (Chamoles et al. 2004) usando 4 metilumbeliferil-alfa-D-glucopiranosido (4-MUG) como substrato y acarbosa como un potente inhibidor para alfa-glucosidasas presentes en granulocitos que no están relacionadas con la enfermedad de Pompe.

El estudio permite obtener tres expresiones de actividad enzimática así: Actividad de Alfa Glucosidasa total a pH: 3,8, Actividad de Alfa Glucosidasa Inhibida a pH: 3,8 en presencia de Acarbosa 120 uM y Alfa glucosidasa Neutra total a pH: 7.0. Se uso como tampón el Acetato de Sodio 0,4 M (Protocolo Anexo XXIX)

#### **4.5.3.1 Determinación en sangre seca recogida sobre papel:**

Extraer sangre capilar por punción en yema del dedo (o talón en caso de niños) y rellenar todos los círculos existentes en el papel de recogida (Fig. 6). Dejar secar a temperatura ambiente y guardarlo posteriormente en una bolsa de plástico para protegerlo de la humedad. Conservar a 4°C hasta su procesado.

Para determinar la actividad enzimática, se extrae la enzima de la gota de sangre mediante agua y se pone a incubar durante 20h, tras ese tiempo se para la reacción y se mide la fluorescencia, la cual se valorara en una curva de calibración.

**Figura 6. Toma de muestra para DBS de Pompe.**

#### 4.5.3.2 Determinación en linfocitos para Pompe:

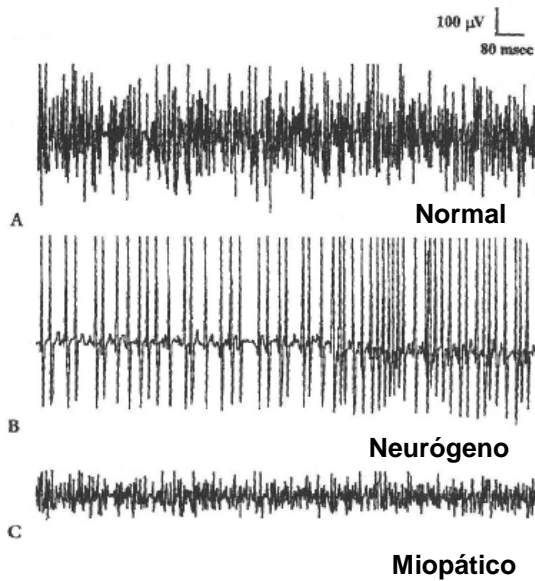
Extraer 10 ml de sangre venosa (7 ml para niños) en un tubo con EDTA y mantener refrigerado a 4°C hasta obtener los linfocitos en no más de 24h, (protocolo Anexo XXIX-XXX).

#### **4.6 ELECTROMIOGRAFÍA (EMG)**

La evaluación neurofisiológica se ha llevado a cabo mediante estudios electromiográficos en músculos distales y proximales de extremidades inferiores y superiores. Mediante la introducción de una aguja electrodo, que se inserta a través de la piel hasta que entre al tejido muscular, se ha analizado la presencia patológica de actividad espontánea en el reposo, incluyendo la fibrilaciones, ondas positivas y descargas repetitivas complejas. También se han analizado los potenciales de acción de unidad motora (PUAM) voluntarios, teniendo en cuenta su morfología (duración, amplitud, fases), su estabilidad y las características de disparo (activación, reclutamiento y patrón de interferencia).

Mientras se va insertando el electrodo provee una información valiosa en cuanto a la actividad muscular como al nervio que inerva ese músculo. Dicho estudio se ha llevado a cabo siguiendo procedimientos convencionales.

Algunos pacientes pueden encontrar el procedimiento doloroso, otros experimentan un pequeño nivel de discomfort cuando la aguja es insertada. Los músculos a los cuales se les realiza el procedimiento pueden quedar adoloridos por uno o dos días después del procedimiento.



**Figura 7. Patrones de EMG.**

En la figura 7 podemos ver los patrones que nos podemos encontrar en el estudio de EMG.

#### 4.7 IMAGEN: TAC O RM MUSCULAR

La evaluación de las imágenes ha permitido ver los grupos musculares afectados, evaluar el tipo de alteración morfológica y gradar la afectación muscular.

En cuanto a los cambios morfológicos, se ha valorado la alteración en la densidad (TAC) o intensidad de señal (RM) en el músculo secundaria al reemplazamiento de este tejido por material fibro-adiposo y a su vez, se han evaluado los cambios en el volumen muscular lo cual permite estimar la posible atrofia o hipertrofia.

El protocolo empleado para la evaluación de los pacientes se detalla a continuación:

- El examen se ha llevado a cabo con sistemas de RM de 1.5T (Plataforma Excite GE, y Magnetom Avanto, Siemens). Después de Junio de 2007, se han practicado los estudios en un equipo de 3T (Magnetom Trio, Siemens).
- Las secuencias se han obtenido en el plano axial, perpendicular a la mayoría de vientres musculares, lo cual facilita su identificación.
- Se han utilizado dos secuencias:
  - I. Secuencias T1.  
Es una secuencia ideal para mostrar la anatomía siendo útil para valorar los cambios de señal y volumen muscular.
  - II. Secuencias STIR  
Permite valorar la existencia de "edema" muscular.

- Ambas secuencias se han obtenido en 6 segmentos:
  - I. Nivel cervical.
  - II. Cintura escapular.
  - III. Nivel tóraco-abdominal.
  - IV. Cintura pelviana.
  - V. Muslos.
  - VI. Piernas.

Para gradar la afectación de los diversos grupos musculares en las técnicas de imagen se ha empleado una técnica semicuantitativa que se detalla a continuación:

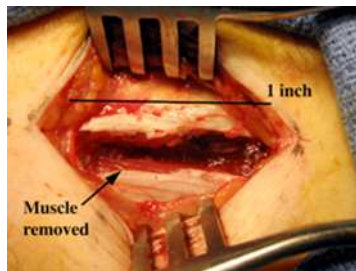
- Grado M0: músculo con intensidad de señal normal (hipointensidad homogénea en contraste con la hiperintensidad de la grasa subcutánea e intramuscular).
- Grado M1: hiperintensidad intramuscular parcheada pero no confluyente.
- Grado M2: hiperintensidad intramuscular parcheada confluyente, afectando <50% del volumen del músculo.
- Grado M3: hiperintensidad homogénea o parcheada confluyente afectando >50% del volumen del músculo.

## 4.8 ESTUDIO DE BIOPSIA MUSCULAR

### 4.8.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

La biopsia muscular se ha realizado a todos los pacientes y fue obtenida mediante incisión abierta, el procedimiento empleado se detalla a continuación:

- La elección del músculo dependió de las pruebas clínicas, aunque en la mayoría de los casos el músculo elegido fue el deltoides.
- Aplicación de anestesia local (Mepivacaína al 1%) en el punto de incisión, infiltrando la piel y el tejido celular subcutáneo hasta la fascia del músculo.
- Incisión quirúrgica cutánea de aproximadamente 4-5 cm de longitud, paralelamente a la orientación de los fascículos musculares y en diferente localización según el músculo diana.
- Incisión quirúrgica en la fascia muscular y en el epimisio.
- Separación de un fascículo muscular mediante disector y sección del mismo.



**Figura 8. Toma de biopsia muscular.**



- La muestra tomada son dos fragmentos con un tamaño aproximado de 1 cm de longitud y 0.5 cm de diámetro (Fig. 8).
- Sutura de la fascia muscular con nylon de nº2 y sutura cutánea con seda nº2.

Los dos fragmentos se congelan en isopentano enfriado con nitrógeno líquido, para el posterior crioseccionamiento en los estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos por un lado, y por otro para la obtención de homogenados para las inmunotransferencias. Además se toma un pequeño trozo de uno de los fragmentos, antes de ser congelado, y se procesa para microscopía electrónica.

#### **4.8.2 HISTOQUÍMICA CONVENCIONAL**

Se obtienen de la biopsia cortes transversales de 7 micras de grosor en criostato (Leica CM1520) para realizar las tinciones básicas en patología muscular (Tabla 7) (Dubowitz et al. 2013). Dichas técnicas se emplean para el estudio morfológico en el microscopio óptico (Olympus BX50 y la cámara Leica MC170-HD) de las biopsias musculares.

**Tabla 7. Métodos de rutina para el análisis de biopsias musculares**

<b>TINCIÓN</b>	<b>USO</b>
<b>HE</b>	Estructura general: tamaño y forma de las fibras, posición de núcleos, fibrosis, inflamación, nervios, vasos sanguíneos...
<b>Tricrómico modificado Engel</b>	Mitocondrias (Fibras1 más oscuras), cuerpos nemalínicos, refuerzos subsarcolémicos y vacuolas ribeteadas; en rojo.
<b>ORO</b>	Lípidos intracelulares en forma de puntos rojos y lípidos del tejido adiposo en rojo.
<b>PAS</b>	Se puede ver el patrón de fibras, acúmulos de glucógeno (muy teñido) y ausencia de glucógeno (sin teñir).
<b>NADH-TR</b>	Se puede ver el patrón de fibras y alteraciones miofibrilares.
<b>SDH</b>	Se puede ver el patrón de fibras y anomalía en número de mitocondrias.
<b>COX</b>	Se puede ver el patrón de fibras y defectos de tinción.
<b>Miofosforilasa</b>	Ausente en la enfermedad de McArdle.
<b>MAD</b>	Ausencia o deficiencia de la enzima, tiene un significado incierto.
<b>Fosfatasa ácida</b>	Elevada en alteraciones de almacenamiento lisosomal y miopatías vacuolares.

La tinción más importante es la **Hematoxilina & Eosina**, ya que muestra claramente toda la estructura del tejido y nos da información de las fibras, núcleos, tejido fibro-adiposo, presencia de células inflamatorias, así como componentes vasculares y neurales. Con la HE vemos los núcleos en azul y las fibras musculares en rosa, mientras que el tejido conectivo adquiere un color ligeramente rosado, las fibras basófilas tienen un color azulado y si usamos Hematoxilina de Harris's podemos ver también en azul las mitocondrias. De color rojo podemos diferenciar las áreas eosinófilas que pueden corresponder a acúmulos anormales de material miofibrilar o a cuerpos citoplásmicos. (Protocolo de tinción Anexo IX).

Con el **TME** es fácil observar un aumento endomisial del conectivo, que adquiere un color azul-verdoso. Pero esta técnica se utiliza sobre todo para identificar estructuras que se tiñen de color rojo como los cuerpos nemalínicos, los acúmulos mitocondriales, las vacuolas ribeteadas, así como acúmulos de material miofibrilar. (Protocolo de tinción Anexo IX-X).

Los enzimas oxidativos son útiles para determinar alteraciones mitocondriales, así como la distribución del patrón de fibras. La **NADH-TR**, tiñe tanto las mitocondrias como el retículo sarcoplásmico, por ello esta técnica es buena para ver alteraciones de la red intermiofibrilar. (Protocolo de tinción Anexo XIII). La **SDH**, en contraste con la anterior es específica de mitocondrias. Por ello es una buena técnica para detectar alteraciones mitocondriales. (Protocolo de tinción Anexo XIII).

La **COX**, por su parte, también es específica de mitocondrias, pero en su caso es un componente integral de la membrana mitocondrial que está codificado por el DNAmít; por lo que un defecto de tinción nos está indicando posibles mutaciones en el DNAmít. (Protocolo de tinción Anexo XIV).

La **miofosforilasa**, es un enzima encargado de la degradación del glucógeno. La actividad de este enzima depende del tipo de fibra, por lo que con él podemos identificar también el patrón de fibras, pero lo más importante es que un defecto de este enzima es característico de la glucogenosis tipo V (enfermedad de McArdle). (Protocolo de tinción Anexo XII-XIII).

El **PAS** se utiliza para detectar el exceso o déficit de glucógeno, pero además también se utiliza para determinar el patrón de fibras. (Protocolo de tinción Anexo IX).

Las hidrolasas (**ATPasa**), son los enzimas más importantes para revelar el patrón de fibras. Se realiza a pH ácido (4.3) y básico (9.4) para demostrar el patrón recíproco de fibras 1 y 2. (Protocolo de tinción Anexo X, XI, XII). En algunos laboratorios debido a lo delicado de la tinción debido a la sensibilidad del pH y el calor, se ha sustituido por inmunohistoquímicas con la miosina.

La **fosfatasa ácida** es un enzima localizado en los lisosomas, se utiliza para identificar degeneración y necrosis de fibras. Se puede identificar con ella la lipofuscina, por ello su actividad es mayor en adultos que en niños.

Es muy útil en casos de glucogenosis tipo II (deficiencia de maltasa ácida), desórdenes lisosomales y miopatías vacuolares. (Protocolo de tinción Anexo XV).

Los lípidos los identificamos con el **ORO**, la concentración y el tamaño de las gotas varía según el tipo de fibra. Esta técnica es útil en enfermedades que afectan al metabolismo lipídico. Un exceso de gotas y/o de gran tamaño nos indica alteraciones lipídicas. (Protocolo de tinción Anexo XIV-XV).

La **MAD** tiene un significado incierto, aunque una deficiencia de este enzima indica mutaciones en la población. También pueden aparecer reducciones secundarias por causas desconocidas. Es útil para detectar la presencia de agregados tubulares. (Protocolo de tinción Anexo XIV).

#### **4.8.3 MEDIDA PARA VARIABILIDAD DEL TAMAÑO DE FIBRAS:**

Realizamos este estudio mediante el programa ImageJ y sobre imágenes 10x de HE (Dubowitz et al. 2013). En estas imágenes dibujamos el contorno de las fibras y medimos el diámetro menor de al menos 100 fibras por paciente, dando al programa la siguiente escala: 2.600 pixels/um y seleccionando como medida "área" y "fit ellipse". Sólo nos interesa el diámetro menor debido a que las secciones obtenidas no son siempre transversales y por tanto el diámetro menor es la única medida que no está alterada por esta causa.

Una vez obtenidos los diámetros menores, pasamos a calcular el coeficiente de variabilidad, que se calcula de la siguiente manera:

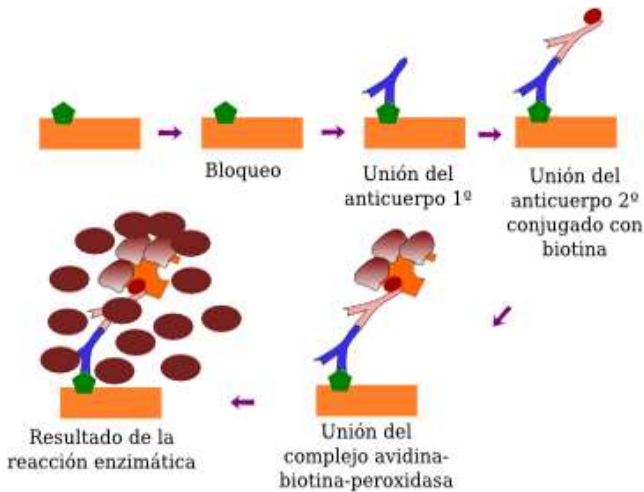
$$\frac{\text{Desviación estándar} \times 100}{\text{Media del diámetro de fibras}}$$

En un músculo normal, este coeficiente es menor de 250. Un coeficiente mayor nos indica que hay anormalidad en el tamaño de las fibras.

#### **4.8.4 INMUNOHISTOQUÍMICA/INMUNOFLUORESCENCIA**

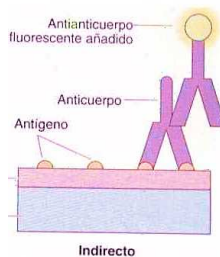
El estudio del patrón de distribución intracelular de las proteínas implicadas en las distrofias se realiza, en primera instancia, mediante técnicas inmunohistoquímicas sobre secciones transversales de criostato de tejido muscular de 7 micras de grosor, lo que permite una visión global del tejido. El principio de esta técnica se basa en la especificidad del antígeno-anticuerpo.

La inmunohistoquímica se lleva a cabo mediante un método indirecto avidina-estreptavidina-peroxidasa (ABC) (Fig. 9). En este caso, tras incubar con los anticuerpos primarios monoclonales correspondientes (Tabla 8), se incuban los cortes con una IgG biotinilada adecuada al anticuerpo primario y seguidamente se incuba con estreptavidina (DAKO). Finalmente se revela con diaminobencidina (DAKO) que forma un precipitado de color marrón que podemos ver al microscopio óptico. (Protocolo Anexo XV-XVI).



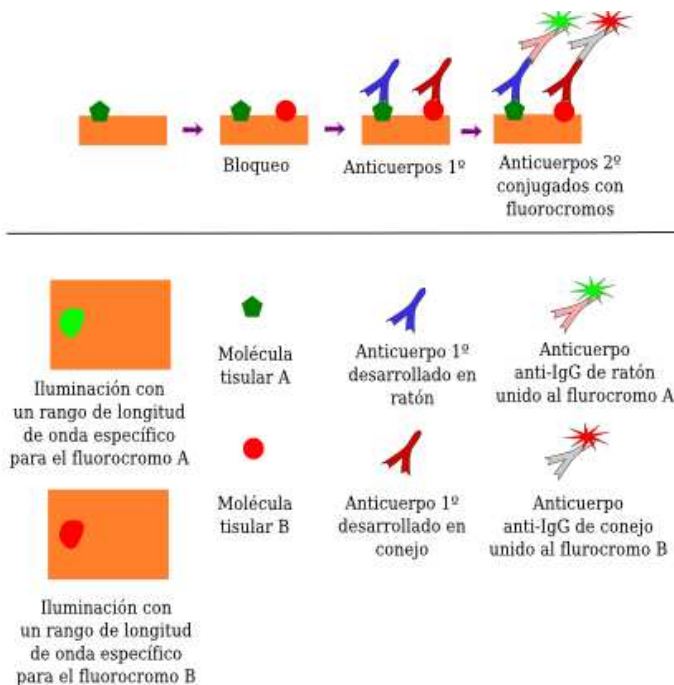
**Figura 9. Inmunohistoquímica.**

En el caso de la inmunofluorescencia, utilizamos un sistema en indirecto en dos pasos, es decir, tras incubar con el anticuerpo primario monoclonal correspondiente (Tabla 8), incubamos con una IgG adecuada al primario marcada con un fluorocromo (Fluoresceína o Rodamina). Tras esto visualizamos en el microscopio de fluorescencia con la luz de excitación adecuada al fluorocromo utilizado.



**Figura 10. Inmunofluorescencia indirecta.**

Mediante la inmunofluorescencia, en algunos casos, como en las miopatías inflamatorias, realizamos una detección simultánea de dos moléculas situadas en el mismo tejido. Lo conseguimos gracias a que los dos anticuerpos primarios proceden de dos animales y por tanto podemos utilizar IgG's de dos animales diferentes marcadas cada una con un fluorocromo diferente (Fig. 11) (Protocolos Anexo XVI).



**Figura 11. Marcateje doble en inmunofluorescencia.**

Todas las proteínas testadas son comparadas en muestras controles; la espectrina se utilizó como control de tinción en todos los casos. Para el estudio de fluorescencia utilizamos un microscopio de fluorescencia (Olympus BX41) acoplado a una cámara (Nikon).



**Tabla 8. Anticuerpos monoclonales utilizados en inmunohistoquímica (IHQ) e inmunotransferencia (ITF).**

PROTEINA	CASA COMERCIAL	DILUCION IHQ/IF	DILUCIO N ITF
C5-b9	C5b-9 (Ae11) SANTA CRUZ	<b>1/50</b>	---
Calpaína 12A2	NCL-CALP-2C4 NOVOCASTRA	---	<b>1/100</b>
Calpaína 2C4	NCL-CALP-12A2 NOVOCASTRA	---	<b>1/50</b>
Caveolina-3	C38320 Transduction Lab	---	<b>1/50</b>
CD4	DAKO	<b>1/50</b>	---
CD68	SANTA CRUZ	<b>1/50</b>	---
CD8	SANTA CRUZ	<b>1/30</b>	---
Disferlina	NCL- HAMLET NOVOCASTRA	<b>1/40</b>	<b>1/30</b>
Distrofina 1	NCL-DYS1 NOVOCASTRA	<b>1/20</b>	<b>1/100</b>
Distrofina 2	NCL-DYS2 NOVOCASTRA	<b>1/20</b>	<b>1/30</b>
Distrofina 3	NCL-DYS3 NOVOCASTRA	<b>1/20</b>	<b>1/30</b>
Emerina	NCL-EMERIN NOVOCASTRA	---	<b>1/100</b>

Espectrina	NCL-SPEC1 NOVOCASTRA	<b>1/100</b>	---
Lamina A/C	SANTA CRUZ	---	<b>1/50</b>
Merosina (alfa 2)	NCL-MEROSIN NOVOCASTRA	---	<b>1/50</b>
MHC/HLA	MHC I (W6/32) SANTA CRUZ	<b>1/50</b>	---
$\alpha$ -Distroglicano	UPSTATE	---	<b>1/1000</b>
$\alpha$ -Sarcoglicano	NCL-aSARC NOVOCASTRA	<b>1/100</b>	<b>1/60</b>
$\beta$ -Sarcoglicano	NCL-bSARC NOVOCASTRA	<b>1/50</b>	<b>1/30</b>

#### 4.8.5 INMUNOTRANSFERENCIA

Realizamos esta técnica con la mayoría de proteínas implicadas en desórdenes musculares, para estudiar la presencia de la proteína en el músculo de cada paciente y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas, en nuestro caso lo hacemos respecto a la miosina.

El fragmento de músculo se homogeneiza 1:10 (g/vol) en tampón Tris 6 mM, pH 7.6, suplementado con 10 mM EDTA y 2% de SDS con el Ultra Turrax, para obtener un extracto de proteínas, en el cual determinamos la concentración de proteínas mediante el método de Lowry (Lowry et al. 1951).

Las proteínas, de este extracto, se separan mediante electroforesis (SDS-PAGE) en geles de poliacrilamida en gradiente del 3-8% y 4-12% según el tamaño de la proteína, dado que las proteínas que estudiamos tienen tamaños muy variados (desde los 427 KDa de la distrofina hasta los 17 KDa de la caveolina-3), y posteriormente se transfieren a membranas de nitrocelulosa según el método de Towbin (Towbin H et al. 1979). Estas membranas las bloqueamos con tampón TBS-Tween (0.01%) suplementado con 1% BSA durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se incuban las membranas con los anticuerpos primarios monoclonales resumidos en la tabla 8. Tras varios lavados de 10 minutos con TBS-Tween (0.01%), se incuban con el anticuerpo secundario anti-mouse o anti-goat, según sea el primario, marcado con fosfatasa alcalina (Sigma) durante una hora. Tras realizar lavados de 10 minutos con TBS se procede al revelado con bromocloroindolil fosfato / nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) (Sigma). Finalmente el gel post-blot se tiñe con azul de Coomassie para valorar la cantidad de proteína en la banda de la miosina.

La densitometría, tanto del gel como de la membrana, se hace mediante el programa de análisis Image J.

Para el estudio de los niveles de calpaína-3 en las muestras añadimos un agente reductor (invitrogen) y en los tampones un antioxidante (invitrogen) para evitar la oxidación de las proteínas.

#### **4.8.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

Todas las muestras cuando se obtienen, una parte se procesa para microscopía electrónica y se incluye en araldita (Protocolo de inclusión Anexo XVII), pero sólo en algunos casos se realizan los semifinos y ultrafinos para el análisis de la ultraestructura al microscopio electrónico (Philips CM100).

Estos casos son los que responden de forma afirmativa a una o varias de las preguntas del siguiente cuestionario (Tabla 9), durante el análisis histológico de la biopsia al microscopio óptico.

**Tabla 9. Cuestionario al microscopio óptico previo a decisión de estudio de microscopia electrónica.**

<b>MICROSCOPIO ÓPTICO</b>	<b>INFORMACIÓN QUE NOS DA LA ULTRAESTRUCTURA</b>
¿La biopsia tiene apariencia normal?	La ultraestructura puede ser anormal, aunque parezca normal al microscopio óptico.
¿Hay fibras rojo rotas?	Podemos ver alteraciones mitocondriales
¿En el TME podemos ver inclusiones rojas?	Podemos detectar cuerpos citoplásmicos o sarcoplásmicos, e incluso podemos ver agregados tubulares.
¿En el TME vemos vacuolas ribeteadas?	Sugiere la presencia de cuerpos membranosos, inclusiones filamentosas o cuerpos de inclusión.
¿Vemos defectos de tinción en la NADH-TR?	Podemos identificar cores o inclusiones miofibrilares.
¿Vemos exceso de NADH-TR?	Podemos ver alteraciones mitocondriales.
¿Vemos exceso de PAS?	Sugiere exceso de glucógeno.
¿Vemos exceso de ORO?	Alteraciones lipídicas o mitocondriales.
¿Áreas oscuras en algunas fibras con la HE y el TME?	Presencia de acúmulos de material miofibrilar (desmina, actina...).
¿Presencia de cosas inusuales que no pueden ser interpretadas?	La ultraestructura puede revelar su naturaleza.

## 4.9 ANALISIS ENZIMATICO

### 4.9.1 CADENA RESPIRATORIA:

Se partió de 20-30 mg de tejido que fue homogeneizado en 15 volúmenes de tampón fosfato 20 mM pH= 7 en un homogenizador manual de vidrio. La fracción rica en mitocondrias se obtuvo centrifugando este homogenado a 800x g, a 4°C, durante 10 minutos y recogiendo el sobrenadante con pipeta Pasteur, situándolo inmediatamente en un recipiente con hielo para evitar la degradación enzimática.

La actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial fue estudiada mediante técnicas cinético-colorimétricas, según técnicas descritas con modificaciones (DiMauro, et al., 1987), en un espectrofotómetro DU-68 (Beckman Instrument) con el software incorporado para la medida de reacciones cinéticas.

- El complejo I (NADH CoQ1 oxidoreductasa sensible a rotenona) se determinó mediante el seguimiento de oxidación del NADH a 340 nm en tampón fosfato 20 mM pH=8, NADH 0.2 mM, Na<sub>3</sub>N 1 mM, BSA-EDTA 0.1% y CoQ1 200 µM. La reacción fue inhibida al 80% tras añadir rotenona 5µM.

- El complejo II (succinato deshidrogenasa) se determinó monitorizando la oxidación del succinato (32 mM) a 600 nm, en un tampón fosfato 50 mM pH=7, KCN 1.5 mM y CoQ1 50  $\mu$ M, en presencia de un aceptor artificial de electrones, el 2,6 diclorofenolindofenol 0.1 mM.
- El complejo III (Decilubiquinol citocromo c oxidorreductasa), sensible a antimicina, fue medido observando la producción de citocromo c reducido a 550 nm, en una mezcla de tampón fosfato 50 mM pH=7.5, NaN<sub>3</sub> 2 mM, BSA-EDTA 0.1%, citocromo c 1 mM y 50  $\mu$ M de decilubiquinol (DBH2). La reacción fue inhibida en más de un 90% con 10  $\mu$ L de antimicina A (1 mg/mL en etanol al 50%). El DBH2 se obtuvo mediante reducción de decilubiquinona comercial (DB) en presencia de borohidruro sódico en medio ácido con posterior reconstitución en etanol del residuo seco del extracto en éter/hexano.
- La actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa) se determinó observando la disminución de la absorbancia a 550 nm producida por la oxidación del citocromo c reducido (80  $\mu$ M) en una solución con tampón fosfato 10 mM pH=7.
- Se determinaron las actividades de los complejos I+III (NADH-citocromo C-reductasa) y II+III (Succinato-citocromo C-reductasa) a 550 nm, utilizando como aceptor electrónico el citocromo C oxidado, y como sustratos donadores NADH 1 mM y succinato 30 mM, respectivamente. La temperatura de incubación fue de 30°C para todas las reacciones excepto para el complejo IV que fue de 38°C y el volumen final en todas ellas fue de 1 mL, siendo realizado cada ensayo por duplicado.

Las actividades enzimáticas se calcularon en UI/L utilizando los siguientes coeficientes de absorptividad milimolar: 6,8 para complejo I; 19,2 para complejo II, y 21,0 para los complejos III, IV, I+III y II+III, empleando las siguientes fórmulas:

Actividad de complejo I (actividad sensible a rotenona):

$$\Delta (\text{Abs/min}) = \text{Abs/min con CoQ1} - \text{Abs/min con rotenona}$$

Actividad de complejo II:

$$\Delta \text{ de la reacción con el CoQ1}$$

Los resultados de actividad enzimática fueron referenciados a la actividad de la citrato sintasa, enzima de matriz mitocondrial utilizado como marcador de contenido mitocondrial celular. Su actividad fue determinada midiendo el incremento de absorbancia a 412 nm por minuto que se produce por la reacción del DTNB (ácido 5-5' ditió bis 2-nitrobenzoico) 100  $\mu\text{M}$  con coenzima A libre, formada por la condensación del acetil-CoA (350  $\mu\text{g/mL}$ ) con el oxalacetato 0.5 mM, en una solución con tampón Tris-HCl 75 mM pH=8 y tritón X-100 al 0.1 %.

Para el cálculo de la actividad se empleó la siguiente fórmula:

Actividad de Citrato sintasa:

$$\Delta (\text{Abs/min}) = \text{Abs/min con oxalacetato}$$

Actividad de complejo III (actividad sensible a antimicina):

$$\Delta = \text{Abs/min SIN antimicina} - \text{Abs/min CON antimicina}$$



Actividad de complejo IV (actividad COX):

$$\Delta = \text{Abs/min de la reacción con citocromo C reducido}$$

Actividad de complejo I+III:

$$\Delta (\text{Abs/min}) = \text{Abs/min con NADH}$$

Actividad de complejo II+III:

$$\Delta (\text{Abs/min}) = \text{Abs/min con succinato}$$

#### **4.10 ANÁLISIS GENÉTICOS**

Los análisis genéticos se realizaron en diferentes centros tanto Españoles como Europeos.

Para realizar los análisis, según la proteína a secuenciar obtuvimos DNA o RNA y según el caso lo obtuvimos bien directamente del músculo biopsiado o de la sangre.

El DNA a partir de sangre, lo obtuvimos de entre 10 y 20 ml de sangre periférica (con EDTA como anticoagulante) de cada uno de los individuos estudiados utilizando el Maxwell® 16 Instrument junto con el kit Maxwell® 16 Blood DNA Purification System que automatiza la purificación de ácidos nucleicos usando como principio de separación la lisis celular y la unión de los ácidos nucleicos a partículas de sílice magnetizadas. (Protocolo Anexo XVIII-XIX).

Entre los pasos automatizados que realiza se incluyen:

- Lisis de la muestra en presencia de un agente caotrópico y detergente.
- Unión de ácidos nucleicos a partículas de sílice magnetizadas.
- Lavado de las partículas unidas para separarlas del resto de componentes celulares.
- Elución de los ácidos nucleicos en un tampón que permite añadirlos directamente a la PCR estándar.

Mientras que el DNA a partir de músculo esquelético lo obtuvimos mediante el GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit de SIGMA (G1N10/70/350). (Protocolo Anexo XIX al XXI).

El RNA, por su parte, se obtuvo de manera manual siempre a partir de músculo esquelético. (Protocolo Anexo XXI al XXIII). Para poder realizar el diagnóstico, en los casos en los que obtuvimos RNA, tuvimos que sintetizar cDNA a partir del RNA. Para ello realizamos una retrotranscripción (RT-PCR). (Protocolo Anexo XXIII).

La lectura de la concentración de la muestra de ADN obtenida se llevó a cabo mediante espectrofotometría, midiéndose la densidad óptica (OD) de la muestra a una longitud de onda de 260nm, utilizando el nanodrop. La pureza de la muestra (proporción de proteínas no eliminadas con el fenol), corresponde a la relación OD260/OD280, considerándose una razón en torno a 2 como óptima.

#### **4.10.1 ESTUDIO DE LA CAVEOLINA-3, LAMINA, DISFERLINA, ANO-5, RYR1, FKRP, McARDEL, POMPE, CPTII Y DISTROFINA.**

Se realizó mediante estudio de DNA, bien extraído de sangre o directamente del musculo esquelético. Una vez obtenido el DNA, se realiza la amplificación de fragmentos solapantes que cubren toda la región mediante los primers adecuados a cada caso.

La excepción la aplicamos a la calpaina-3 dado que en sangre no se expresa el exón 15 y lo delicado de esta proteína, obtenemos directamente RNA del músculo esquelético. Una vez obtenido el cDNA se realiza la amplificación de fragmentos solapantes que cubren toda la región.

Los productos de la PCR (Protocolo Anexo XXIV) se resolvieron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%. Para determinar el tamaño del amplificado, se corrieron junto con un marcador de pesos moleculares de 1 kilobase (kb). (Protocolo Anexo XXIV-XXV).

Si el amplificado es correcto realizamos la purificación de la PCR (Protocolo Anexo XXV-XXVI) y por último lo secuenciamos en el AB 3130 xl Genetic Analyzer (Protocolo Anexo XVII).

#### **4.10.2 ESTUDIO MLPA DISTROFINA**

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®) es un método que puede detectar cambios en el número de copias de hasta 50 secuencias de ácido nucleico en una reacción simple. MLPA® identifica rápidamente amplificaciones y deleciones de un gran número de genes, y se puede utilizar tanto para ADN como ARNm.

Solo una reacción de PCR y posterior electroforesis capilar en secuenciador es necesaria para desempeñar el MLPA y el MRC COFFALYSER MLPA-DAT (on-line) para analizar los datos posteriormente. Los resultados se obtienen en 24 horas de hasta 96 muestras en un solo experimento.

En nuestro caso lo utilizamos para detectar deleciones o duplicaciones en el gen de la distrofina (**Kits P034B (DMD1) y P035B (DMD2)**: engloban los 79 exones y el promotor PD427Z (protocolo Anexo XVIII-XIX).

En un principio lo realizamos en los casos en los que detectamos déficit o ausencia de distrofina en la biopsia. Pero durante el estudio cambiamos el procedimiento y se empieza a realizar de manera sistemática en los pacientes de HCK.

#### **4.10.3 PANEL CINTURAS/MIOFIBRILAR MEDIANTE TECNOLOGIA ION TORRENT**

Desarrollamos un panel de genes con los principales genes implicados en miopatías de cinturas o miofibrilares y en glicosilación. Con este panel pretendemos detectar mutaciones en aquellos pacientes que mediante las técnicas tradicionales no conseguimos diagnosticar.

El panel tiene las siguientes características y consta de los siguientes genes (Tabla 10).

**Tabla 10. Características y genes incluidos en el panel de genes.**

<b>125-375 pb</b>	<b>IAD69042_197</b>
<b>99,2 % Coverage</b>	
<b>2 pools primers</b>	<b>667 amplicones</b>
<b>206,39 Kb Panel Size</b>	

<b>GEN</b>	<b>EXONES</b>	<b>Coverage</b>
<i>CAPN3</i>	24	100
<i>DYSF</i>	56	100
<i>SGCG</i>	8	100
<i>SGCA</i>	10	100
<i>SGCB</i>	6	100
<i>SGCD</i>	9	100
<i>TCAP</i>	2	100
<i>TRIM32</i>	2	100
<i>FKRP</i>	4	100
<i>ANO5</i>	22	100
<i>POMT1</i>	20	100
<i>FKTN</i>	11	100
<i>POMT2</i>	21	100
<i>POMGnT1</i>	22	100
<i>ISPD</i>	10	83,93
<i>LMNA</i>	12	99,05
<i>CAV3</i>	2	100
<i>GNE</i>	13	100
<i>LARGE</i>	17	100
<i>FHL1</i>	15	100
<i>EMD</i>	6	100
<i>DES</i>	9	100
<i>CRYAB</i>	3	100

<i>MYOT (TTID)</i>	11	100
<i>LDB3 (ZASP)</i>	20	100
<i>FLNC</i>	48	97,11
<i>BAG3</i>	4	97,23
<i>DNAJB6</i>	11	100
<i>MYH7</i>	41	99,13
<i>VCP</i>	17	100
<i>LAMP2</i>	10	100
<i>DAG1</i>	9	100
<i>TRAPPC11</i>	30	99,4
<i>TNPO3</i>	24	100
<i>HNRPDL</i>	9	100
<i>TTN</i>	1	100
	1	100
	1	100
<i>GMPPB</i>	8	100
<i>GAA</i>	20	99,17
<i>LIMS2</i>	7	96,4
<i>POGLUT1</i>	11	100

Para el análisis de este panel utilizamos la secuenciación por Ion Torrent que es un método de secuenciación de ADN basado en la detección de protones liberados durante la polimerización del ADN. Por lo tanto, este método se guía a través de las polimerizaciones que se llevan a cabo en las cadenas simples de ADN en estudio (Fig.12).

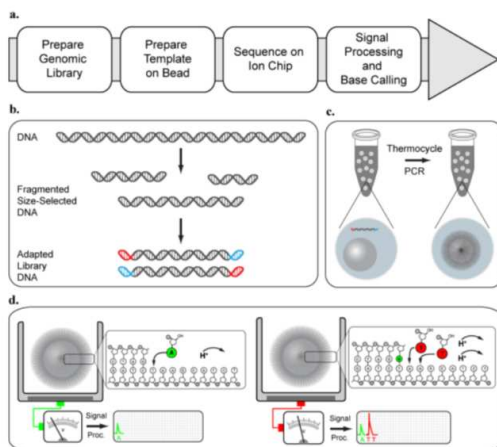


**Figura 12. Ion Torrent y chip.**

Este tipo de secuenciación difiere de los demás tipos en que no usan nucleótidos modificados y que la detección no se realiza vía óptica, sino por detección de pH. La incorporación de desoxirribonucleótidos trifosforilados (dNTP) en el ADN en replicación implica la generación de un enlace covalente y la liberación de un pirofosfato y un protón. El dNTP se incorpora exclusivamente en casos de complementariedad con el nucleótido de la cadena molde. Este principio es en el que se basa esta técnica de secuenciación.

En primer lugar, se aísla el ADN y se corta en fragmentos, los cuales se unen a pequeñas bolas denominadas bead. Cada una de ellas, unidas con millones de fragmentos de ADN, entran en los micropocillos de un microchip. A continuación, se baña el micro-chip con una solución de uno de los nucleótidos. Si el nucleótido se incorpora en la cadena de ADN, se libera un protón, el cual es detectado por la base del pocillo, la cual actúa como un mini-pHmetro (sensor iónico ISFET). Gracias a que cada lámina del microchip es semiconductora, se pueden detectar estos pequeños cambios iónicos.<sup>2</sup> Este proceso se repite cada 15 segundos con una nueva solución de cada nucleótido (Fig. 13).





**Figura 13. Esquema del proceso para secuenciación con Ion Torrent.**

Las señales generadas en los pocillos se transmiten directamente a un ordenador, sin necesidad de ser procesadas durante la transferencia.

Los cambios no descritos en la bibliografía los analizamos mediante pruebas in-silico mediante los programas sift, polyphen, mutation taster, provean, human splicing finder, nnsplce, spliceview, netgene2 e IGV. En base a los resultados obtenidos en estos programas clasificamos los cambios de la siguiente manera:

- Clase 1 - No patógena.
- Clase 2 - Improbable que sea patógena, no puede formalmente probarse.
- Clase 3 - Probablemente patógena, no puede formalmente probarse.
- Clase 4 - Patógena.

### **4.11 ESTUDIO ESTADISTICO:**

En el desarrollo de la Tesis, con el objeto de describir los datos, establecer relaciones y comprobar si existen efectos significativos, se ha utilizado una serie de técnicas básicas en estadística se enumeran a continuación de forma sucinta.

Los datos se han resumido mediante la media, desviación estándar, mediana y primer y tercer cuartil en el caso de las variables continuas y mediante frecuencias absolutas y relativas en el caso de las variables categóricas. Todos los análisis se han realizado mediante el software SPSS v.20.

#### **4.11.1 Estadístico de la Chi-cuadrado.**

Se utiliza para contrastar que existe independencia entre dos variables categóricas. En la Tesis se realizará con el objeto de determinar si hay significatividad entre las pruebas de EMG, RM y los niveles de CK con el diagnóstico y entre la gravedad de la RM y los años de evolución de la HCK. Todos los análisis se han realizado mediante el software SPSS v.20. Los p-valoros inferiores a 0.05 se han considerado estadísticamente significativos.

#### **4.11.2 Modelo de regresión logística multinomial.**

En estadística, la regresión logística multinomial generaliza el método de regresión logística para problemas multibase, es decir, con más de dos posibles resultados discretos. Es decir, se trata de un modelo que se utiliza

para predecir las probabilidades de los diferentes resultados posibles de una distribución categórica como variable dependiente, dado un conjunto de variables independientes. En la Tesis se realiza Para determinar las variables asociadas a una mayor probabilidad de diagnóstico. Se utilizó un modelo de regresión logística con penalización L1 (LASSO). La penalización L1 permite realizar selección de variables en problemas donde el número de muestras es escaso en relación al número total de variables. Los resultados del modelo de regresión logística se han representado mediante gráficas de efectos. Todos los análisis se han realizado mediante el software R (versión 3.2.2). Los p-valores inferiores a 0.05 se han considerado estadísticamente significativos.

## **5 RESULTADOS**



### **5.1 Caracterizar los casos de HiperCKemia en función del perfil clínico.**

Se estudiaron 354 pacientes (276 hombres y 78 mujeres), de los cuales 127 fueron asintomáticos y 227 paucisintomáticos. La media de edad fue 34 años (rango 1-77 años): 32 pacientes con menos de 10 años, 67 pacientes entre 11 y 20 años, 239 pacientes entre 21 y 60 años y 16 pacientes con más de 61 años.

Los niveles de CK sérica, determinados en al menos dos mediciones separadas por paciente, varían en un rango de 250-28000 UI/L. Ciento sesenta pacientes tuvieron niveles séricos de CK entre 1,5x-3x y 194 pacientes tuvieron niveles >3x.

Ochenta y cinco casos (24%) con hiperCKemia familiar y 49 (14%) con hiperCKemia mantenida tras retirada de estatinas. La biopsia no se realizó en 53 (15%) pacientes bien porque rehusaron a realizársela o pertenecían a casos familiares en los cuales no fue necesario realizar biopsia porque se sometieron directamente al estudio genético (MLPA o secuenciación).

Doscientos veintisiete pacientes son paucisintomáticos (64%), de los cuales el 55% presentaban mialgias-calambres, el 33% intolerancia al ejercicio y el 6% coluria. Las características de los pacientes estudiados quedan resumidas en la tabla 11.

El perfil mayoritario en los casos de HCK se caracteriza por pacientes varones mayores de 20 años, que no han tomado estatinas, que no tienen antecedentes familiares y que presentan mialgias-calambres y en ocasiones también intolerancia al ejercicio.

**Tabla 11. Características de los pacientes estudiados.**

		EDAD DETECCIÓN				
		≤10	11-20	21-60	≥61	Total
SEXO	HOMBRE / MUJER	26 / 6	57 / 10	183 / 56	10 / 6	<b>276 / 78</b>
NIVEL CK	1,5x - 3x	5	20	130	5	<b>160</b>
	>3x	27	47	109	11	<b>194</b>
ANTECEDENTES FAMILIARES (%)*		7 (22%)	20 (30%)	55 (23%)	3 (19%)	<b>85</b>
ESTATINAS (%)*		-	-	44 (18%)	5 (31%)	<b>49</b>
CLÍNICA	MIALGIAS - CALAMBRES	9 (28%)	35 (52%)	145 (61%)	7 (44%)	<b>196</b>
	INTOLERANCIA EJERCICIO	5 (16%)	22 (33%)	83 (35%)	5 (31%)	<b>115</b>
	COLURIA	-	7 (10%)	15 (6%)	-	<b>22</b>
	<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>67</b>	<b>239</b>	<b>16</b>	<b>354</b>

\* % de pacientes dentro de su rango de edad.



## 5.2 Determinar la utilidad o rendimiento de las pruebas no invasivas previas a la biopsia muscular.

Como pruebas no invasivas previas a la biopsia muscular en el estudio de las HCK se proponen el estudio por MLPA de distrofina y estudio de la actividad de la alfa-galactosidasa mediante gota seca (DBS) y su actividad en linfocitos.

También realizamos la curva del ac.láctico como prueba previa a la biopsia en los casos que presentaban mialgias-calambres e intolerancia con el ejercicio, pero los resultados obtenidos no fueron concluyentes ya que fueron normales el 96% de los estudios y no concordaban con los casos diagnosticados de glucogenosis, por lo que se decidió establecer como prueba estándar el déficit de miofosforilasa en la biopsia muscular.

**Tabla 12 (a-b). Resultados pruebas no invasivas.**

12 a)		Pruebas realizadas	Pruebas positivas	Pacientes diagnosticados
Distrofina	MLPA	62	17	20
Pompe	DBS	213	16	5

**12 b)**

	DETECCION		NIVEL CK		SEXO	
	<20	>21	1,5x-3x	>3x	H*	M**
POMPE (enfermos/casos estudiados)	1/49	4/164	2/95	3/118	3/166	2/47
MLPA (enfermos/casos estudiados)	14/39	3/23	1/7	16/55	15/54	2/8

\*Hombre

\*\*Mujer

El porcentaje de pacientes diagnosticados de Pompe en las HCK es bajo, próximo al 2%, aunque el rendimiento de la prueba es alto para el diagnóstico (sensibilidad 100% y especificidad 95%).

El realizar la prueba no dependerá ni del sexo (hombres 2% positivos, mujeres 4%), ni del nivel de CK (menos de 3x 2% positivos, 2,5% en más de 3x) ni de la edad (menos 20 2% positivos, 2,5% en más de 20). En nuestra opinión deberá realizarse en todos los casos de HCK, como previa a la biopsia (Tabla 12).

En cuanto al MLPA, vemos que el porcentaje de pacientes diagnosticados es más elevado, aunque no es real a la proporción de distrofinopatías en población HCK, ya que el número de estudiados es bajo y en varios casos el estudio fue post-biopsia y estuvo dirigido. Pero el que las distrofinopatías representen un 5% de la serie de HCK nos hace considerar recomendable realizar siempre MLPA previo a la biopsia (Tabla 12).

Además el rendimiento de la prueba es alto, tiene una especificidad del 100% y en nuestro caso, que incluimos mayores de 21 y niveles de CK menores de 3x, la sensibilidad la aumentamos hasta el 85%. Por lo que aconsejamos también realizarla previa a la biopsia y en todos los casos de HCK sin excepción de sexo, edad o nivel de CK. Con esta metodología no conseguimos una sensibilidad del 100% ya que no detecta las mutaciones puntuales en el gen de la distrofina. Con lo cual en los pacientes que tengan MLPA negativo pero un déficit e distrofina en la biopsia o con antecedentes familiares de distrofinopatía, deberá realizarse la secuenciación del gen.

### 5.3 Aportación del EMG y RM muscular en diagnóstico de las HCK

Otras pruebas previas a la biopsia son la RM muscular y el EMG.

#### 5.3.1 Estudio Electrofisiológico

Se realizó electromiograma (EMG) en 273 pacientes: 137 (51%) fueron normales, 102 (38%) mostraron alteraciones de tipo miopático, 7 (3%) mostraron signos de hiperactividad y otros 25 (9%) mostraron alteraciones de tipo neurógeno.

Como vemos en la tabla 13, no guarda relación el resultado del EMG con el diagnóstico en todos los casos. Aunque vemos alteración de EMG en el 49% de los pacientes estudiados, solo en el 22% de los casos vemos una concordancia diagnóstico-EMG patológico. Por otro lado, vemos también que un 55% de los pacientes con patología inespecífica muestran un EMG normal.

**Tabla 13. Resultados EMG vs diagnóstico.**

DIAGNÓSTICO	EMG			
	NORMAL	MIOPÁTICO	NEURÓGENO	HIPERACTIVIDAD
MIOPÁTICO ESPECÍFICO	38	53	3	-
MIOPÁTICO INESPECÍFICO	91	50	18	5
NEURÓGENO	-	-	3	1
NORMAL	8	2	1	-

El EMG no es una prueba con mucha sensibilidad (51% sensibilidad) y no aporta suficiente información como para descartar la realización de biopsia, una posible excepción podrían ser los casos de EMG con signos de hiperactividad que son específicos de un diagnóstico neurógeno o miopático inespecífico, entre los cuales estarían canalopatías que no hemos comprobado genéticamente.

**Tabla 14. Análisis contingencia para estudiar la asociación entre alcanzar un diagnóstico y las alteraciones en el EMG. Valores observados y valores esperados (entre paréntesis) si los factores fuesen independientes y valor chi-cuadrado.**

	EMG		Total
	NORMAL	ALTERADO	
IDIOPÁTICO	91 (82,3)	73 (81,7)	164
DIAGNOSTICADO	46 (54,7)	63 (54,3)	109
Total	137	136	273

#### Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,623 <sup>a</sup>	1	,032
N de casos válidos	273		

<sup>a</sup>. 0 casillas (0,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 54,30.

A pesar de ello, el detectar alteraciones en el EMG nos aumenta la probabilidad diagnóstico, ya que mediante el test chi-cuadrado y con una significación del 0,05 vemos que la probabilidad de alcanzar un diagnóstico no es independiente del resultado del EMG (Tabla 14), pero lo que queda claro es que no es específico para concretar el diagnóstico.

### 5.3.2 Estudio imagen mediante RM muscular

De las 144 RM analizadas el 33% fueron normales y se encontraron alteraciones en 97 (67%); de éstas, 50 mostraron una afectación muscular generalizada y 47 un patrón focal (Tabla 15). Los cambios más acusados se localizaban en pelvis, muslos y piernas, como podemos ver en la figura 1a.

El 42% de los pacientes con patología inespecífica mostro alteraciones en la RM, aunque no son específicas de un patrón de una patología concreta. Analizando mediante chi-cuadrado vemos con una significación del 0,05 que las muestras son independientes, por lo que alcanzar un diagnóstico no dependerá de alteraciones en la RM (Tabla 16).

**Tabla 15. Resultados RM muscular vs diagnóstico.**

DIAGNÓSTICO	RM		
	NORMAL	P.LOCAL	P.GENERALIZADO
MIOPÁTICO ESPECÍFICO	18	21	27
MIOPÁTICO INESPECÍFICO	27	25	19
NEUROGENO			4
NORMAL	2	1	

**Tabla 16. Análisis de contingencia para estudiar la asociación entre alcanzar un diagnóstico y las alteraciones en la RM. Valores observados y valores esperados (entre paréntesis) si los factores fuesen independientes y valor chi-cuadrado.**

	RM		Total
	NORMAL	ALTERADO	
IDIOPÁTICO	27 (23,2)	44 (47,8)	71
DIAGNOSTICADO	20 (23,8)	53 (49,2)	73
Total	47	97	144

### Pruebas de chi-cuadrado

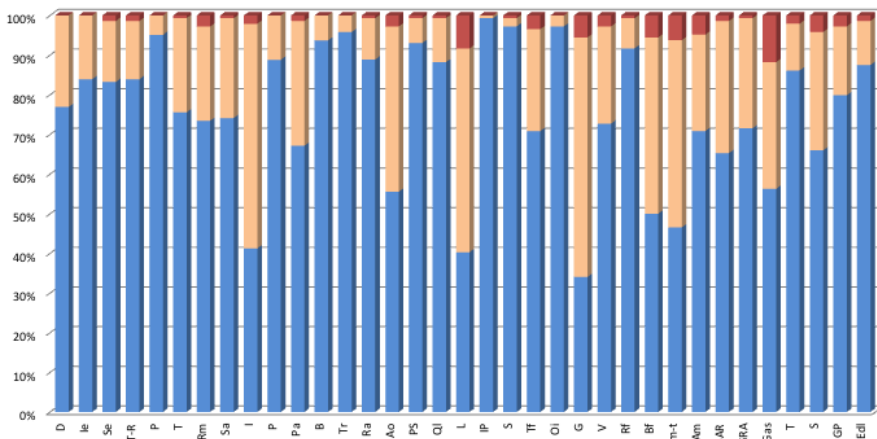
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson N de casos válidos	1,850 <sup>a</sup> 144	1	0,174

<sup>a</sup>. 0 casillas (0,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 23,17.

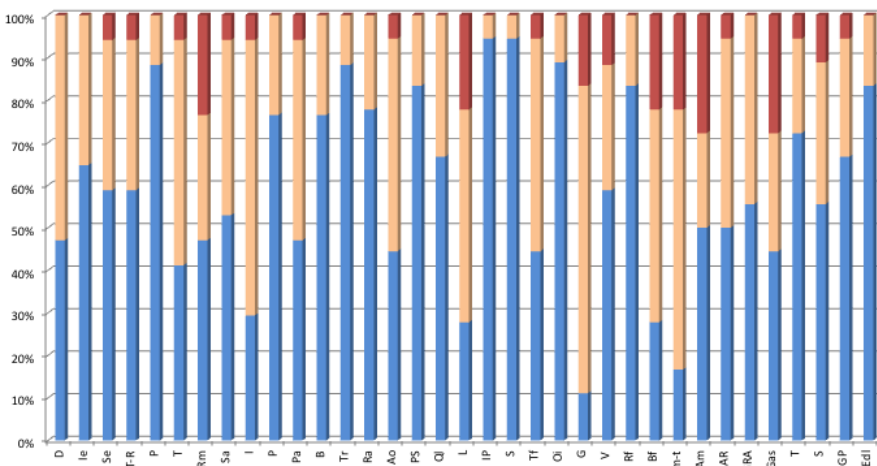
No se detectaron patrones específicos que orientasen al diagnóstico etiológico de forma generalizada como vemos en la figura 14a, pero si vemos patrones orientativos al analizar los subgrupos por diagnóstico. Además en la mayoría de los casos los patrones se cumplían en estadios avanzados, aunque si era orientativo el patrón pre-sintomático en la LGMD2A, en las formas tardías de LGMD2B y patrones axiales en las glucogenosis.

Si analizamos las resonancias por grupos diagnósticos, en este caso vemos que se cumplen 3 patrones específicos que indican la evolución de estos casos. Son las distrofias musculares de cinturas (Fig. 14b), las distrofinopatías (Fig. 14c) y las glucogenosis (Fig. 14d).

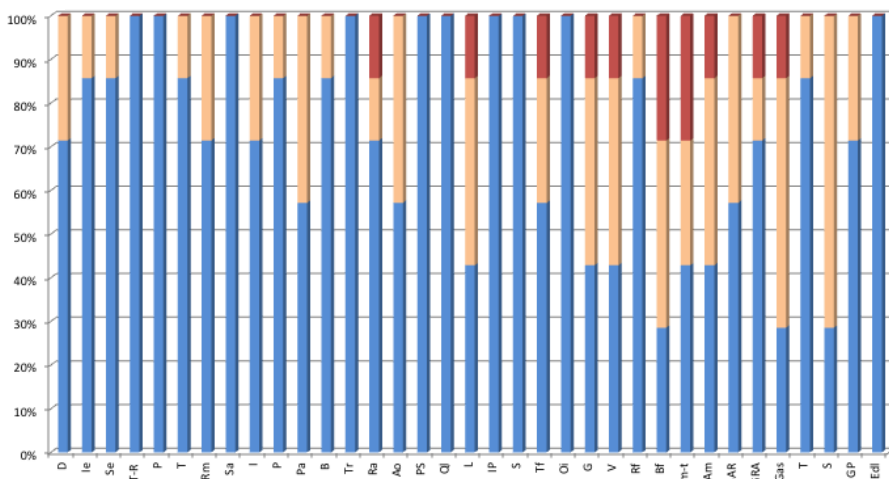
14a)



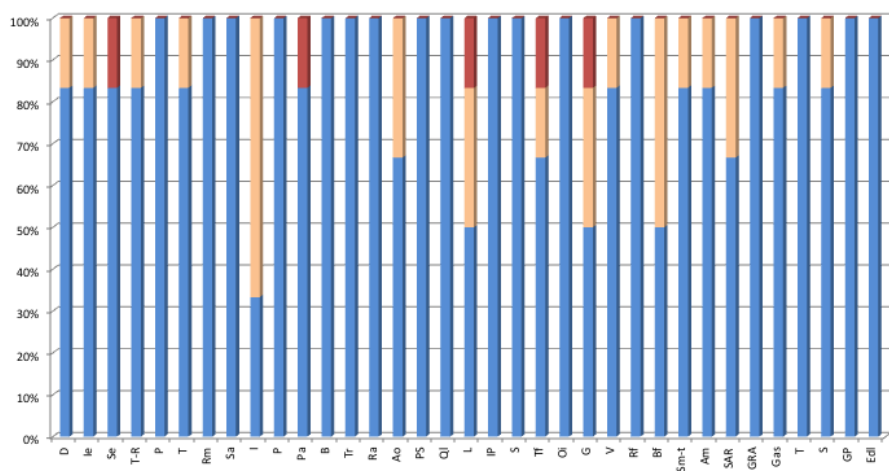
14b)



14c)



14d)



**Figura 14. a) La frecuencia de la participación de los músculos individuales entre todos los pacientes, b) entre LGMD, c) entre distrofinopatías y d) glucogenosis. Columnas azules: no afectado; Columnas rojas: afectados con la puntuación de 1 a 2; Columnas verdes: afectada con puntuación de 3.**



Aunque chi-cuadrado nos indica que es independiente la gravedad de los hallazgos de la RM, de los años de evolución del paciente (Tabla 17), las alteraciones graves las detectamos de forma mayoritaria en pacientes de larga evolución (la RM se estudia a más de 5 años de la detección).

**Tabla 17. Análisis de contingencia para estudiar la asociación entre años de evolución y la gravedad de la RM. Valores observados y valores esperados (entre paréntesis) si los factores fuesen independientes y valor chi-cuadrado.**

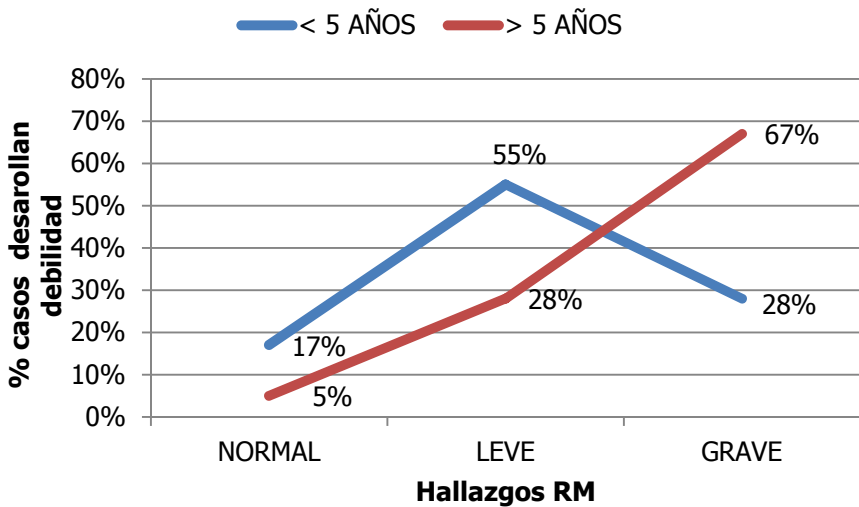
RM	EVOLUCIÓN		
	< 5 AÑOS	> 5 AÑOS	Total
NORMAL	27 (24,5)	20 (22,5)	47
LEVE	35 (33,3)	29 (30,7)	64
GRAVE	13 (17,2)	20 (15,8)	33
Total	75	69	144

### Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2,845 <sup>a</sup>	2	0,241
N de casos válidos	145		

<sup>a</sup>. 0 casillas (0,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 15,81.

Destacar que los casos que evolucionan a formas graves clínicamente (desarrollo debilidad), ya la RM en los 5 primeros años, mayoritariamente, ya muestran un patrón leve-grave; mientras que en las RM a mas de 5 años de evolución vemos aumento progresivo de la gravedad de los hallazgos (Fig. 15).



**Figura 15. Representación de cómo son los hallazgos en la RM antes y después de 5 años en los pacientes que desarrollan debilidad.**

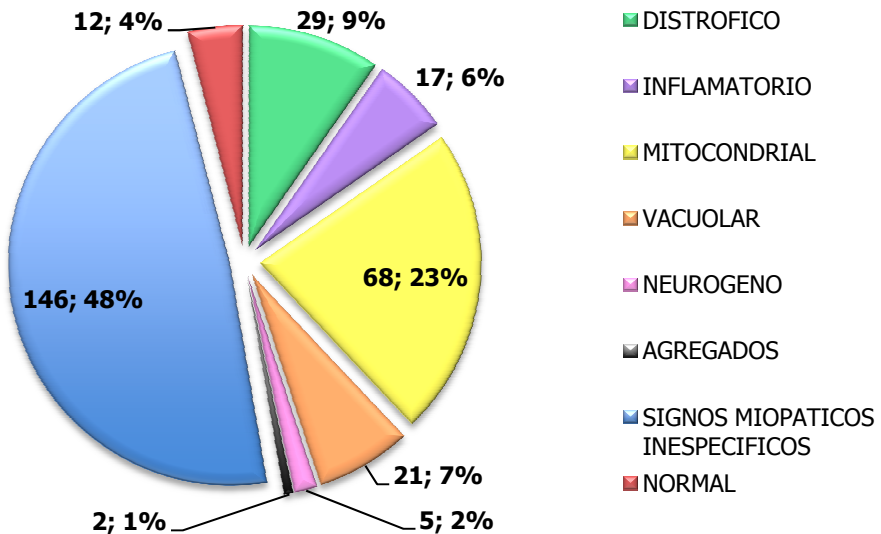
Por ello el uso de la RM en la evolución de estos pacientes es muy importante ya que la mayoría de estos casos son estadios pre-sintomáticos o formas tardías.

La RM no es una herramienta útil al 100% para el orientar al diagnóstico, solo en algunos casos nos muestra patrones, pero si una herramienta eficaz para predecir la evolución de formas pre-sintomáticas o tardías, por lo que la importancia de su utilización está en el seguimiento de estos paciente.

## 5.4 Ver el rendimiento de la biopsia muscular, tanto en su perfil histológico como en estudios proteicos y enzimáticos.

### 5.4.1 Estudio histopatológico

Las tinciones de rutina muestran histología normal solo en el 4% de los casos. Los hallazgos más frecuentes fueron variabilidad de tamaño (atrofia e hipertrofia) y forma de las fibras, núcleos centrales, atrofia de fibras y predominio de fibras tipo 1. También encontramos refuerzos mitocondriales, COX negativas o/e hiporeactivas, "ragged red"... (Tabla 18; Fig. 17). Según los hallazgos histopatológicos de las biopsias musculares agrupamos a los 300 pacientes según muestra la Fig. 16.



**Figura 16. Resultados de las biopsias.**

**Tabla 18. Hallazgos histopatológicos, en Tricrómico de Engel, en enzimas oxidativos (SDH, NADH-TR y COX) y miofosforilasa.**

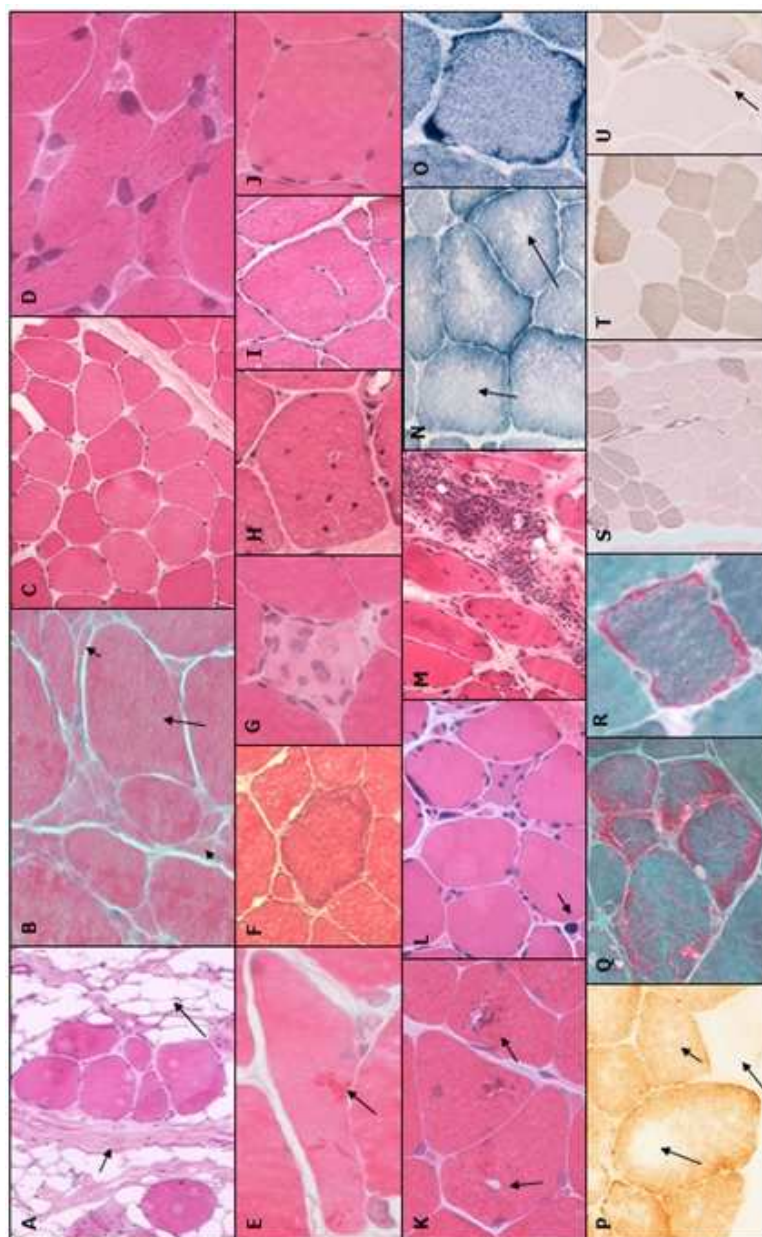
Hallazgos	n	%
<b>Núcleos centrales</b>	<b>130</b>	<b>43</b>
Aumento en nº de núcleos sarcolémicos	54	18
"Clumps" nucleares	22	7
<b>Variabilidad de tamaño y forma de fibras</b>	<b>214</b>	<b>71</b>
<b>Atrofia de fibras</b>	<b>156</b>	<b>52</b>
<b>Hipertrofia de fibras</b>	<b>96</b>	<b>32</b>
Fibras regenerativas	63	21
Fibras necróticas	42	14
Fibras anguladas	38	13
"Splitting" de fibras	17	6
<b>Predominio fibras tipo 1</b>	<b>122</b>	<b>41</b>
Predominio fibras tipo 2	4	1
Atrofia de fibras tipo 2	15	5
Infiltrados inflamatorios	28	9
Vacuolas	13	4
Vacuolas ribeteadas	7	2
Basofilia	39	13
Cuerpos hialinos eosinófilos	4	1
Aumento de tejido conectivo	54	18
Reemplazamiento graso	3	1
<b>Refuerzos mitocondriales (Tricrómico, SDH y COX)</b>	<b>102</b>	<b>34</b>
"Moth eaten" (SDH y COX)	14	5
COX negativas o/e hiporeactivas	47	16
"Ragged red" (Tricrómico)	24	8
"Cores" (SDH y COX)	12	4
Miofosforilasa negativa	13	4

Entre los cambios específicos encontramos un 7% con alteraciones vacuolares, 13 de ellas son enfermedad de McArdle, 1 con enfermedad de Pompe, un 0.3% casos con miopatía miofibrilar; un 6% con signos de inflamación; un 23% con alteraciones mitocondriales.

Además tenemos un 9% de casos con perfil distrófico, es decir, que cumplen 3 de estos 4 criterios: aumento de tejido conectivo, reemplazamiento graso, necrosis-regeneración y variabilidad en tamaño y forma de las fibras; y un 2% casos con perfil neurógeno, es decir, con atrofia neurógena y agrupamiento según el tipo de fibras. El 48% restante mostraron cambios miopáticos, pero no específicos.

#### **5.4.2 Estudio Proteico/Enzimático**

Encontramos alternaciones proteicas o enzimáticas en el 42% de los casos, tanto biopsiados como no biopsiados. De todas ellas las mayoritarias son en calpaina y cadena respiratoria, seguidas de miofosforilasa, distrofina y disferlina, según muestra la tabla 19.



**Figura 17. T. histopatológicas de rutina:** A-M, **hematoxilina-eosina** (A) aumento de tejido conectivo y reemplazamiento graso; (B) atrofia de fibras, hipertrofia de fibras y fibras anguladas; (C) variabilidad de tamaño y forma de fibras; (D) fibras regenerativas; (E) cuerpos hialinos eosinófilos; (F) basofilia; (G) fibras necróticas en proceso de fagocitosis; (H) núcleos centrales; (I) "Splitting" de fibras; (J) aumento en nº de núcleos sarcoplásmicos; (K) vacuolas y vacuolas ribeteadas; (L) "Clumps" nucleares; (M) infiltrados inflamatorios. N-O, **SDH-TR** (N) "Moth eaten" y "cores"; (O) refuerzos mitocondriales. P, **COX** (P) "Moth eaten", "cores" y COX negativas. Q-R, **Tricrónico de Engel** (Q) "Ragged red"; (R) refuerzos mitocondriales. S-U, **ATPAasa 9.4** (S) predominio fibras tipo 1; (T) predominio fibras tipo 2 y (U) atrofia de fibras tipo 2.

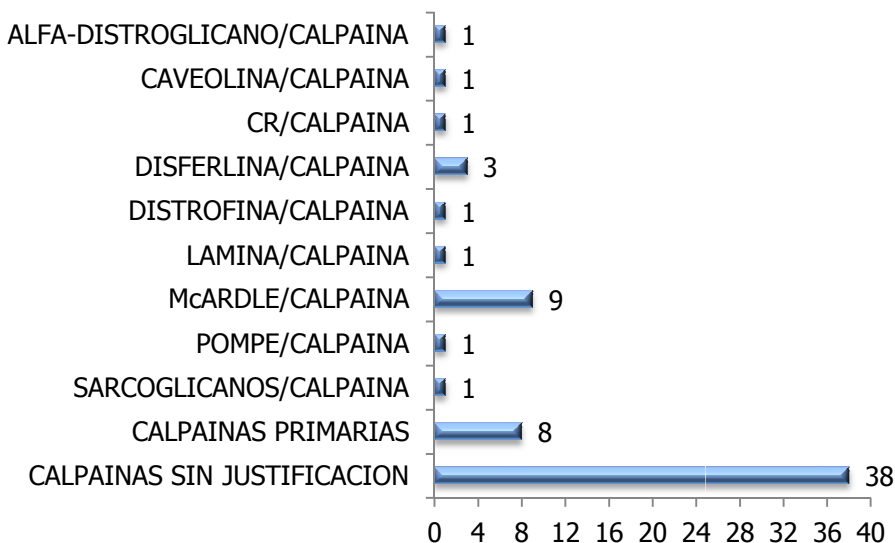
**Tabla 19. Estudio proteico frente al diagnóstico genético.**

	DÉFICIT PROT / ACT.ENZ	GENÉTICA	REND (%)
<b>ALTERACIONES PROTEICAS (n=300)</b>			
DISTROFINA	11	11	100%
<b>CALPAÍNA</b>	<b>65</b>	8	14%
DISFERLINA	10	9	90%
CAVEOLINA	11	1	9%
LAMINA	8	1	12%
SARCOGLICANOS	5	-	0%
α-DISTROGLICANO	5	1	25%
<b>ALTERACIONES ENZIMÁTICAS</b>			
<b>MIOFOSFORILASA (n=295)</b>	<b>13</b>	13	100%
<b>CADENA RESPIRATORIA (n=107)</b>	<b>16</b>	7	44%

En cuanto a las alteraciones proteicas vemos déficits asociados a otras alteraciones concretas. Las alteraciones en calpaina las vemos secundarias en la mayoría de déficits, pero sobre todo en disferlina y en el 70% de los casos de déficit de miofosforilasa (Fig. 18) Los sarcoglicanos detectados los vemos como alteraciones secundarias a déficits de distrofina. Y la merosina la vemos secundaria en los déficits primarios de alfa-distroglicano.

Esto nos lleva a concluir que las alteraciones proteicas son en muchos casos déficits asociados a una patología primaria, por ello siempre debemos analizar estos déficits genéticamente. Aunque en el caso de la calpaina es muy importante analizar otras causas primarias antes de secuenciar el gen, ya

que vemos que es una proteína que se altera en la mayoría de las patologías de forma secundaria.

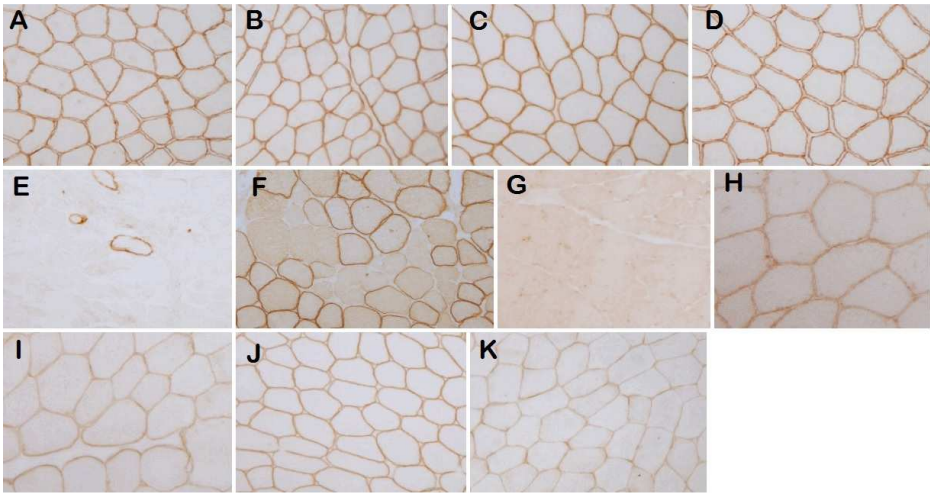


**Figura 18. Representación de los déficits de calpaina y su relación secundaria a otras proteínas.**

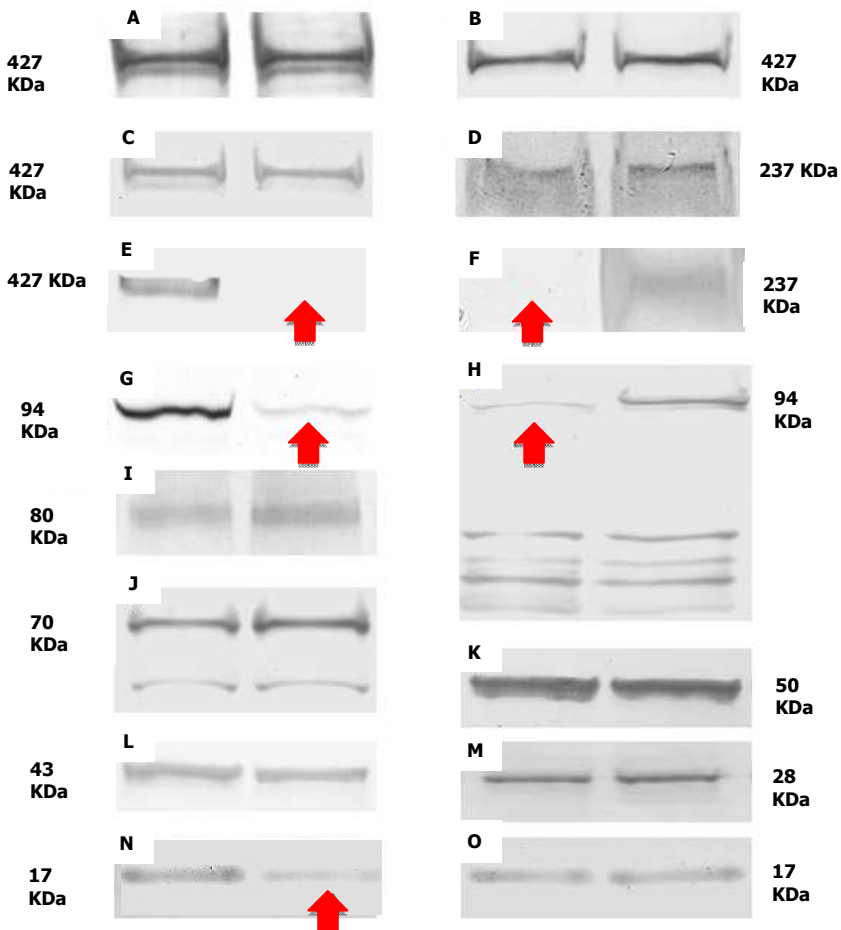
En cuanto a las técnicas utilizadas hemos visto que salvo la calpaina, todas las demás proteínas las podemos analizar en las biopsias mediante únicamente fluorescencia o inmunohistoquímica sin necesidad de inmunotransferencia, ya que mediante las tres técnicas obtenemos los mismos resultados (Fig. 19a y 19b). Muy importante a tener en cuenta es el caso de la caveolina que es necesario testarla mediante inmunofluorescencia ya que es más sensible que con la histoquímica el anticuerpo que utilizamos. (Fig. 20)



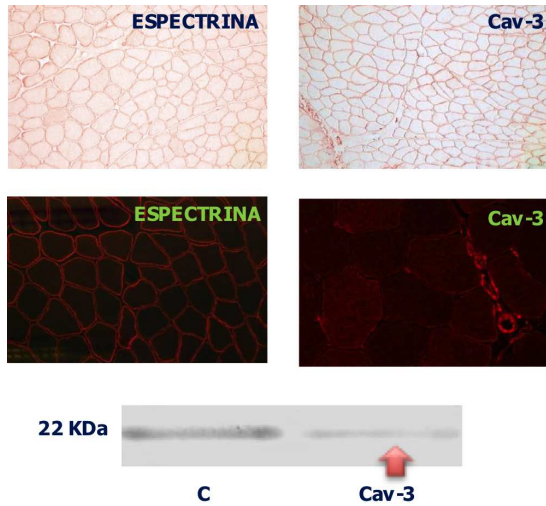
En la calpaina por su parte solo vemos resultados mediante inmunotransferencia; por lo que esta proteína debería analizarse en segundo plano, dado que es secundaria en la mayoría de casos, y únicamente mediante esta técnica (Fig. 21)



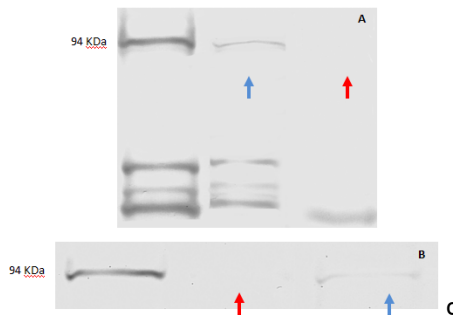
**Figura 19. a) Inmunohistoquímicas: (A) espectrina (control), (B) alfa-sarcoglicano, (C) beta-sarcoglicano, (D, E y F) distrofina, (G y H) disferlina, (I) caveolina3, (J) emerina y (K) alfa-distroglicano.**



**Figura 19. b) Inmunotransferencias:** (A y E) distrofina 1, (B) distrofina 2, (C) distrofina 3, (D y F) disferlina, (G) calpaína 2C4, (H) calpaína 12A2, (I) merosina, (J) Lamina A/C, (K) alfa-sarcoglicano, (L) beta-sarcoglicano, (M) emerina y (N y O) caveolina. Las flechas rojas ausencia o reducción comparado con los controles.

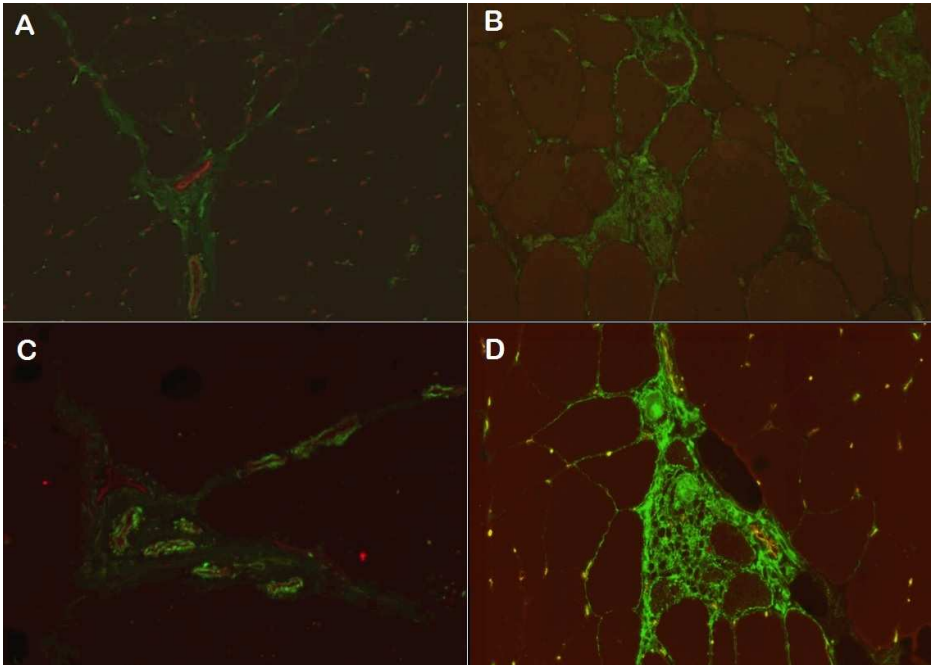


**Figura 20. Comparación del estudio de caveolina-3 mediante las tres técnicas analizadas. La flecha roja indica ligera disminución de proteína.**



**Figura 21. Inmunotransferencia: (A) calpaína 12A2, (B) calpaína 2C4. Las flechas azules indican disminución de proteína y las rojas ausencia comparado con los controles.**

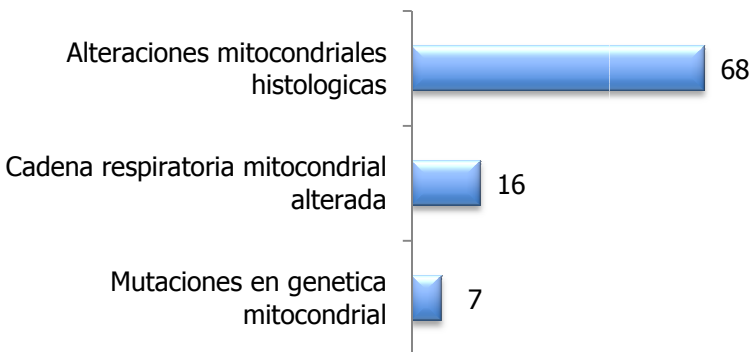
Mediante inmunofluorescencia también realizamos el análisis de infiltrados inflamatorios debido a la alta sensibilidad de esta técnica, ya que en muchos casos estos infiltrados son minoritarios (Fig. 22). Además el estudio de inflamación lo hacemos también tras el estudio previo de alteraciones de proteínas implicadas en distrofias musculares, ya que en el 45% de los casos hemos detectados que los infiltrados inflamatorios no se deben a una miopatía inflamatoria primaria, sino que son secundarios a casos de distrofia muscular.



**Figura 22. Estudio de marcadores inflamatorios en las biopsias con infiltrados. (A) CD68, (B) CD4, (C) C5b9, (D) CD8.**

No realizamos estudio de proteínas miofibrilares, dado que no aparecen como estándar en el algoritmo diagnóstico clásico de estudio de las HCK.

En cuanto a las alteraciones enzimáticas vemos que el déficit de miofosforilasa en la biopsia se correlaciona al 100% con el análisis genético; mientras que la cadena respiratoria, vemos que no todos los casos con alteraciones mitocondriales a nivel histológico tienen alterada la cadena respiratoria y que incluso no todas las alteraciones enzimáticas a nivel de la cadena respiratoria se corresponden con mutaciones de la genética mitocondrial que confirmen miopatías mitocondrial (Fig. 23). Esto nos indica que las mitocondrias se alteran en el musculo no solo debido a alteraciones mitocondriales primarias, sino que seguramente proliferan las mitocondrias para suplir de manera secundaria otras alteraciones musculares.



**Figura 23. Representación esquemática en números absolutos de los diferentes niveles de estudio de las anomalías mitocondriales.**

5.5 Comprobar la aportación de los estudios genéticos tanto dirigidos como aplicando un paneles de genes específicos.

5.5.1 Estudio genético dirigido

En cuanto a los estudios dirigidos, de las 149 alteraciones enzimáticas o proteicas detectadas, solo en el 38% confirmamos genéticamente estas alteraciones como causas primarias. Según la tabla 19, vemos que los mejores rendimientos, nos los proporcionan distrofina, disferlina y miofosforilasa. Las mutaciones encontradas en estos pacientes son las que muestran la tabla 20.

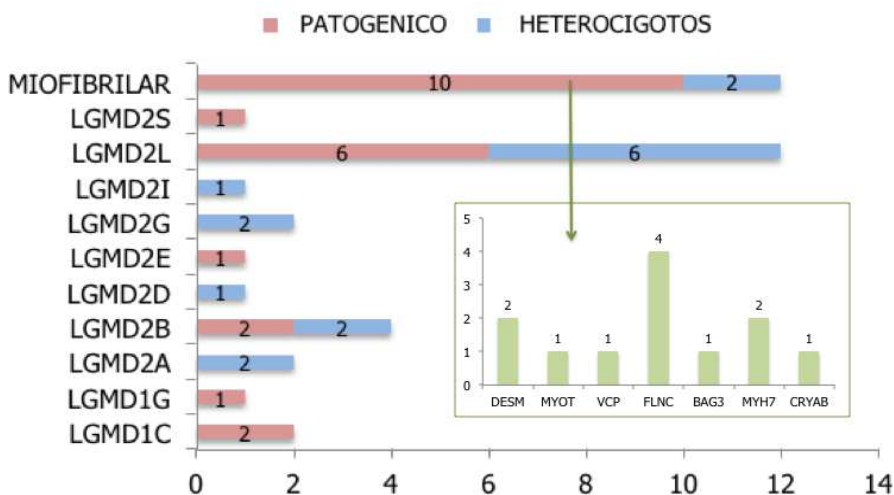
Tabla 20. Mutaciones en los genes de estudios genéticos dirigidos.

DYS	dup 2-7	dup 13-17	dup 42	del 3-4	del 6-8
	del 45-48	del 45-48, 50-52	del 45-51	del 45-55	del 48-49
	del 43	del 70			
GAA	c.-32-13 T>G c.2406_2407insC	c.875A>G	c.271G>A	c.1704C>G	c.1048 G>A
CAPN3	c.1714C>T	c.2362_2362delin sTCATCT	M262L	c.550delA	c.1657G>A
	c.606T>C	c.706G>A	c.2243G>A		
DYSF	c.5776C>T	c.701G>A	c.6042 dupA	c.311C>T	c.127insG
PYGM	c.13_14delCT	c.148C>T	c.613G>A		
ANO5	c.191dupA	c.692G>T			
ADNmit	m.13340T>C	m.14484T>C			
LAMIN	c.1311C>T				
CAV	c*20G>C				
RYR	c.1840C>T				
CPTII	c.34C>T				

En ciertos casos el estudio genético dirigido en estos casos en base a la historia familiar (RYR, ANO5, MLPA-DYS), el perfil neurógeno detectado tanto en EMG como en la biopsia (ELA, KENNEDY, CMT) o por los signos de hiperactividad del EMG (DM1). No realizamos estudio de genes implicados en canalopatías, pero no descartamos la presencia de alguna canalopatía entre los idiopáticos, ya que es conocido que pueden presentarse como HCK.

### 5.5.2 Panel de genes

Para el estudio del panel de genes implicados en miopatías de cinturas, miopatías miofibrilares y alteraciones de glicosilación; seleccionamos pacientes del grupo que quedaron como idiopáticos mediante el método clásico de diagnóstico. De estos aceptan realizarse el estudio 61 pacientes y de estos en el 61% de los casos detectamos mutaciones patológicas, 23 pacientes diagnosticados de enfermedad y 16 portadores (Fig. 24)



**Figura 24. Diagnósticos alcanzados con el panel de genes.**

Las mutaciones patológicas detectadas quedan resumidas en la tabla 21.

**Tabla 21. Mutaciones detectadas en los diferentes genes del panel de genes.**

<b>ANO5</b>	c.184_185insA c.1747G>A c.155A>G	c.692G>T c.2012A>G	c.1210C>T c.680G>C	c.2222C>G c.103_104delAG	c.2317A>G c.172C>T
<b>FLNC</b>	c.5954C>T	c.6393_6393delG	c.5278_5278delG	c.8165_8165delT	
<b>DYSF</b>	c.853C>T	c.6020G>A	c.6116G>A		
<b>HNRNPDL</b>	c.305_305delC	c.113T>C	c.110A>C		
<b>CAPN3</b>	c.2257G>A	c.1907_1907delC			
<b>CAV3</b>	c.244G>A	c.233C>T			
<b>MYH7</b>	c.4159G>A	c.1317G>A			
<b>TCAP</b>	c.388C>T	c.337C>T			
<b>TRAPPC11</b>	c.2483T>C	c.1058C>G			
<b>DES</b>	c.1372-1G>A	c.58_58delG			
<b>SGCA</b>	c.449C>A				
<b>SGCB</b>	c.513_513delT				
<b>FKRP</b>	c.265C>T				
<b>BAG3</b>	c.821C>T				
<b>CRYAB</b>	c.460G>A				
<b>VCP</b>	c.1327A>C				
<b>MYOT</b>	c.533G>A				

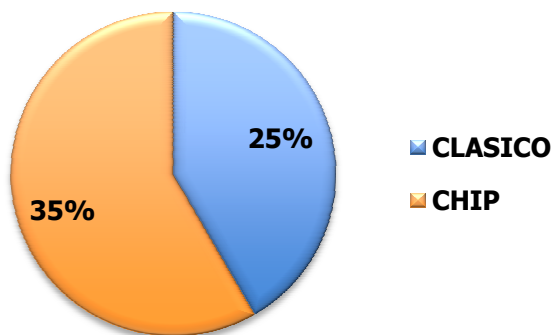
Con este panel también detectamos 71 cambios sinónimos en diferentes genes (ANO5, BAG3, CAPN3, CAV3, CRYAB, DAG1, DES, DYSF, EMD, FHL1, FKRP, FKTN, FLNC, GAA, ISPD, LARGE, LDB3, LMNA, MYH7, MYOT, POMT1, POMT2, SGCA, SGCB, SGCD, SGCG, TRAPPC11, TRIM32).



Gracias a esta secuenciación masiva, que realizamos a partir de DNA extraído de sangre, aumentamos el rendimiento diagnóstico de las HCK en un 10% respecto al abordaje clásico (Fig. 25). Por ello proponemos la realización de estos paneles previos a la biopsia, Además con este panel queda excluido el análisis de proteínas en la biopsia, por lo que el estudio de la biopsia se limitara al marcaje de infiltrados inflamatorios y estudio histológico.

Por otro lado también incluye el estudio del gen GAA por lo que en nuestro caso descartaríamos además el estudio de déficit de alfa-galactosidasa mediante DBS para diagnóstico el diagnóstico del pompe.

Además sería recomendable, diseñar paneles nuevos con genes implicados en miopatías metabólicas y en canalopatías, aumentando la probabilidad de alcanzar un diagnóstico previo a otras pruebas más costosas y más cruentas.



**Figura 25. Representación de los diagnósticos alcanzados con el método clásico vs uso panel genes.**

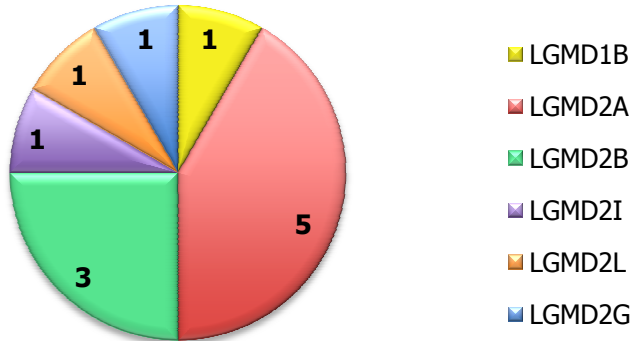
## 5.6 Determinar evolución de las HCK

Durante los años de seguimiento tanto en pacientes retrospectivos como prospectivos, vemos una evolución en algunos casos de hasta 13 años. En el desarrollo de síntomas vemos, según muestra la tabla 6, que actualmente un 27% permanecen asintomáticos, que un 19% evolucionan con desarrollo de debilidad y en cuanto a las mialgias-calambres aumentan un 8% y la intolerancia al ejercicio aumenta un 12,5% (Tabla 22).

Entre los casos que evolucionan a sintomáticos (desarrollan debilidad en el seguimiento), se encuentran de forma mayoritaria las distrofias de cinturas, las glucogenosis y las distrofinopatías. En cuanto a los casos idiopáticos vemos que el 14% de ellos evolucionan a sintomáticos, estos casos son interesantes a la hora de estudios de secuenciación masiva o prioritarios en el estudio de nuevos chips ya que deben ser casos de distrofias no tipificadas en nuestro estudio.

En la evolución de las distrofinopatías vemos que de los 12 casos asintomáticos, el 50% permanecen sin cambios, y solo 7 casos de las 20 distrofinopatías desarrollan debilidad, aunque una debilidad leve ya que continúan siendo ambulantes. A destacar en la evolución es el desarrollo en 6 casos de miocardiopatía. Estos datos son interesantes a la hora del desarrollo de estrategias de skipping para la terapia en casos de distrofia muscular Duchenne.

Por otro lado la evolución de las LGMD el 58% de los casos asintomáticos, permanecen asintomáticos, pero por otro lado un 26% de las distrofias de cinturas desarrollan debilidad, sobre todo calpainopatías y disferlinopatías (Fig. 26).



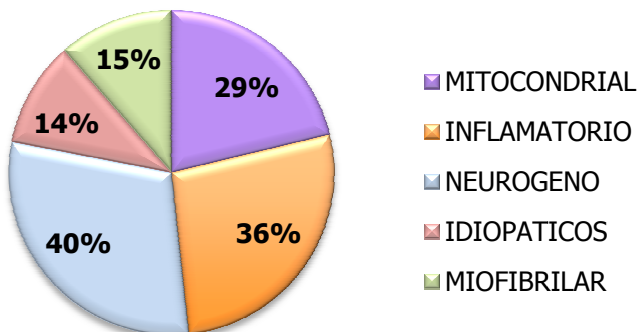
**Figura 26. Proporción de LGMD que evolucionan con debilidad.**

A destacar el caso de las LGMD2L que el 78% permanecen asintomáticos en la evolución, solo un caso desarrolla debilidad y el resto quedan paucisintomáticos.

Las formas asintomáticas y paucisintomáticas corresponden en la mayoría de los casos a portadores.

En cuanto a las glucogenosis, en general, el 57% permanece asintomático. Pero hay que destacar que el 80% de los Pompe desarrollan debilidad frente al 23% de los McArdle, estos permanecen paucisintomáticos en su seguimiento.

En el resto de casos (Fig. 27) destacamos el desarrollo de debilidad en los casos neurógenos e inflamatorios.



**Figura 27. Proporción de otros diagnósticos desarrollan debilidad.**

**Tabla 22. Representación esquemática de la evolución sintomática de los pacientes.**

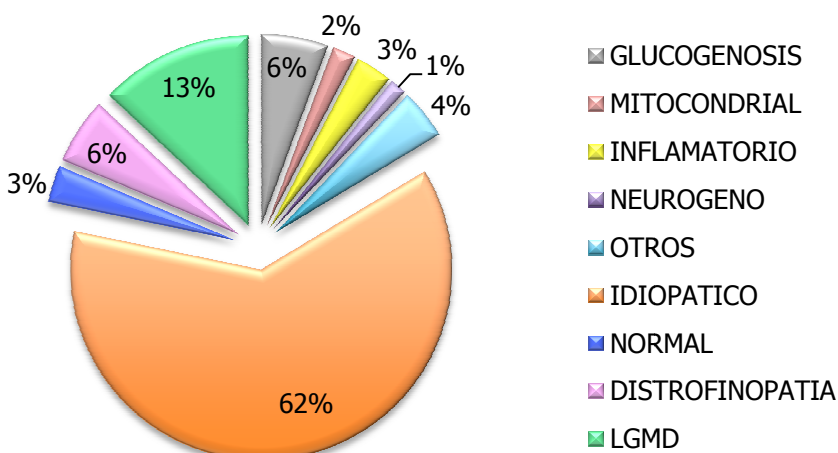
DIAGNÓSTICO	INICIAL			ACTUAL		
	A*	P**	D***	A*	P**	D***
DISTROFINOPATÍA	12	8	-	6	7	7
LGMD	19	27	-	11	23	12
INFLAMATORIO	3	8	-	1	6	4
GLUCOGENOSIS	7	13	-	4	9	7
MITOCONDRIAL	3	4	-	3	2	2
NEUROGENO	1	148	-	-	3	2
OTROS	8	4	-	6	7	2
IDIOPÁTICO	71	7	-	61	127	31
NORMAL	3	8	-	3	8	-
<b>TOTAL</b>	<b>127</b>	<b>227</b>	<b>-</b>	<b>95</b>	<b>192</b>	<b>67</b>

\* ASINTOMÁTICO    \*\* PAUCISINTOMÁTICO    \*\*\* DEBILIDAD

## 5.7 Diseñar un algoritmo diagnóstico que sirva de guía de actuación en los diferentes estratos asistenciales.

### 5.7.1 Diagnósticos

Conseguimos, mediante la metodología empleada, diagnosticar específicamente al 35% y clasificamos como normales al 3%, según vemos en la figura 28. El 62% restante los clasificamos como idiopáticos, ya que si detectamos anomalías, pero no son concluyentes como para alcanzar un diagnóstico.



**Figura 28. Distribución de los diagnósticos en la serie de HCK.**

Como vemos en la tabla 24 se diagnostican pacientes tanto en rango bajo de CK como en rangos altos (18% - 48%), en contra de lo que apuntaban estudios posteriores.

El chi-cuadrado es significativo, por lo que hay una relación entre los niveles de CK y la probabilidad diagnóstica (Tabla 23). El incluir en el estudio los casos que tienen una CK entre 1,5x-3x aumenta claramente la sensibilidad, de hecho, un 28% de los pacientes diagnosticados tenía niveles de CK entre 250-500 UI/L.

**Tabla 23. Significación chi-cuadrado de la asociación entre niveles de CK y la probabilidad de alcanzar un diagnóstico.**

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	33,164 <sup>a</sup>	1	,000
N de casos válidos	354		

<sup>a</sup>. 0 casillas (0,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 59,11.

**Tabla 24. Aportación al diagnóstico final del EMG, RM, biopsia muscular y panel de genes.**

	EMG		RM		BIOPSIA			PANEL DE GENES		
	N <sup>1</sup>	PT <sup>1</sup>	N	PT	N	CI <sup>3</sup>	CE <sup>4</sup>	N	PT	P <sup>5</sup>
GLUCOGENOSIS	10	6	3	5	1	3	16	-	-	-
MITOCONDRIAL	2	4	-	1	-	-	7	-	-	-
INFLAMATORIO	2	8	2	4	-	-	11	-	-	-
NEURÓGENO	-	4	-	4	-	-	5	-	-	-
OTROS	10	2	4	5	-	9	6	-	10	2
IDIOPÁTICO	91	73	27	44	1	114	104	21	-	-
NORMAL	8	3	2	1	9	-	2	1	-	-
DISTROFINOPATÍA	-	15	2	5	-	3	17	-	-	-
LGMD	14	21	7	28	1	18	27	-	13	14

<sup>1</sup> NORMAL / <sup>2</sup> PATOLÓGICO / <sup>3</sup> CAM. INESPECÍFICOS / <sup>4</sup> CAM. ESPECÍFICOS / <sup>5</sup> PORTADOR

**Tabla 25. Relación diagnóstico final con el perfil clínico.**

	SEXO		CK		EDAD		AF		EST		CLÍNICA	
	H <sup>1</sup>	M <sup>2</sup>	1,5x-3x	>3x	<20	>21	N <sup>3</sup>	S <sup>4</sup>	N	S	A <sup>5</sup>	PA <sup>6</sup>
GLUCOGENOSIS	14	6	3	17	11	9	18	2	20	-	7	13
MITOCONDRIAL	5	2	3	4	2	5	7	-	7	-	3	4
INFLAMATORIO	8	3	4	7	1	10	8	3	10	1	3	8
NEUROGENO	5	-	1	4	-	5	5	-	3	2	1	4
OTROS	11	4	5	10	7	8	11	4	12	3	8	7
IDIOPÁTICO	177	42	122	97	45	174	175	44	18 4	35	71	14 8
NORMAL	9	2	5	6	4	7	9	2	11	-	3	8
DISTROFINOPATÍA	16	4	1	19	17	3	8	12	20	-	12	8
LGMD	31	15	11	35	13	33	28	18	38	8	19	27

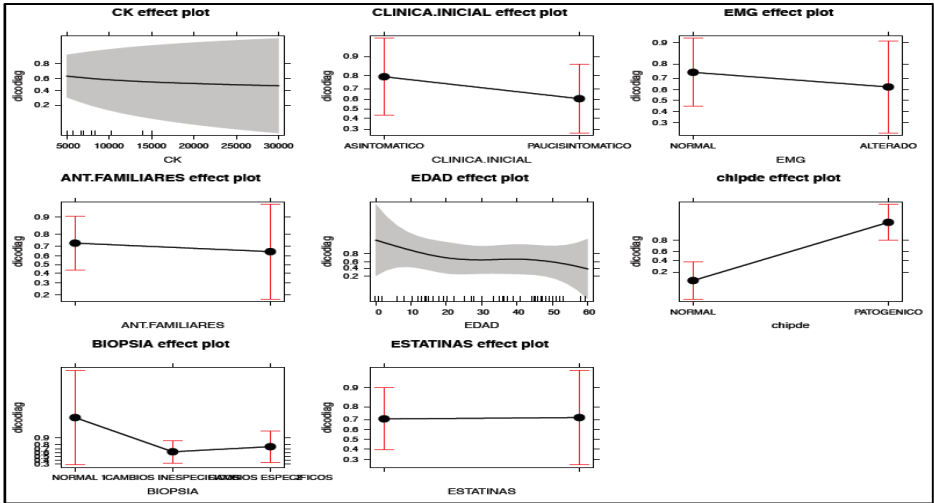
<sup>1</sup> HOMBRE / <sup>2</sup> MUJER / <sup>3</sup> NO / <sup>4</sup> SI / <sup>5</sup> ASINTOMÁTICO / <sup>6</sup> PAUCISINTOMÁTICO

### 5.7.2 Modelo estudio y Algoritmo diagnóstico

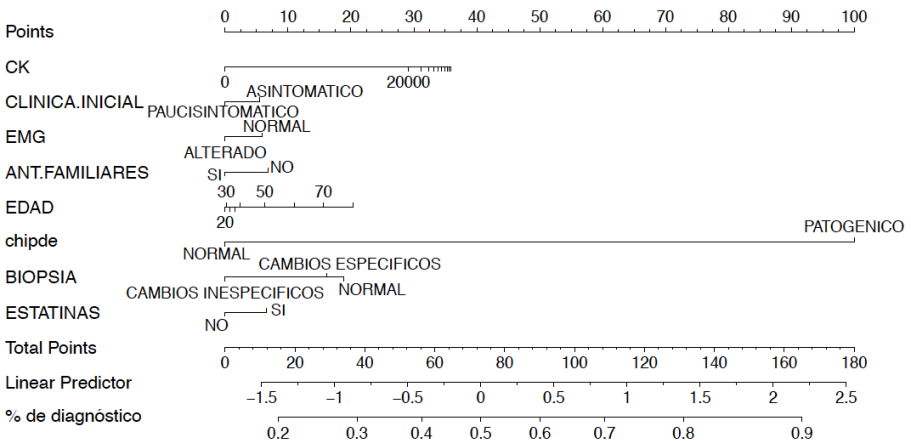
A la vista de los resultados, realizamos un modelo de regresión logística multivariante, en el cual seleccionamos varias variables (Tablas 24 y 25) para analizar cuales aumentan la probabilidad de alcanzar un diagnóstico definitivo en estos pacientes. El modelo muestra un efecto significativo de las variables biopsia ( $p < 0.001$ ) y panel de genes ( $p < 0.001$ ). Las demás variables muestran únicamente tendencias. Todas las relaciones entre las variables predictoras se muestran en una gráfica de efectos (Fig. 29).

Para facilitar la utilización del modelo de regresión logística ajustado, se ha construido un nomograma (Fig. 30). El nomograma permite realizar predicciones personalizadas basadas en los valores de cada variable predictora para un paciente determinado. La forma de utilización del nomograma es la siguiente: Para cada variable se traza una línea perpendicular desde el valor concreto obtenido para esa variable hacia la línea superior de puntos. Una vez obtenidos todos los puntos para cada variable se obtiene la suma total de puntos y se traza otra línea perpendicular desde la línea de puntos totales hacia abajo. El punto donde corta con la línea de probabilidad de diagnóstico sería la predicción para ese paciente concreto.



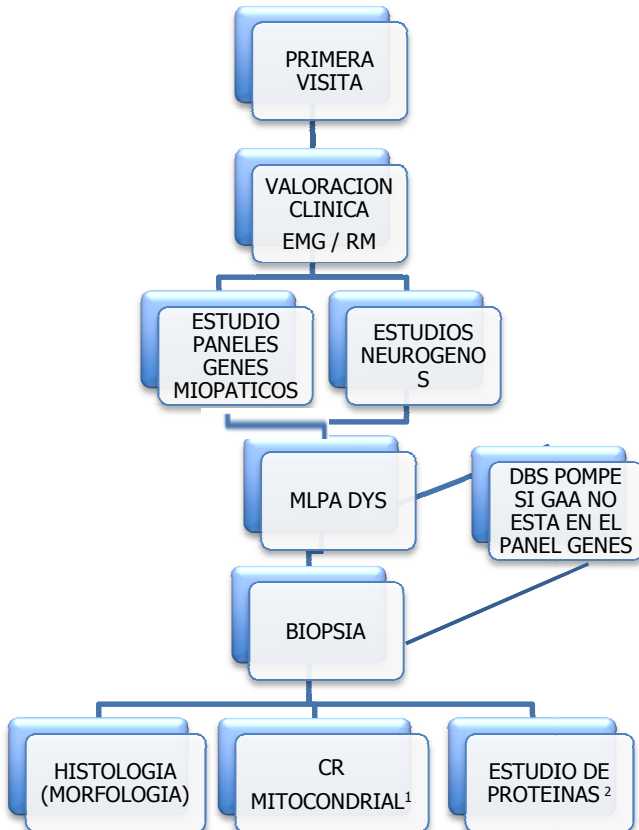


**Figura 29. Representación gráfica de los factores incluidos en el modelo de regresión logística para llegar a un diagnóstico.**



**Figura 30. Nomograma del modelo de regresión logística propuesto.**

A la vista de estos datos proponemos cambios en el algoritmo diagnóstico clásico de las HCK y proponemos el siguiente (Fig. 31):



<sup>1</sup> En casos con proliferación mitocondrial.

<sup>2</sup> Proteínas no estudiadas previamente en panel genes o para confirmar patogenicidad.

**Figura 31. Algoritmo diagnóstico propuesto para las HCK.**



## **6 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**



## 6.1 DISCUSION

Este estudio recoge una serie de pacientes con hiperCKemias de gran tamaño que se realiza de forma prospectiva, seleccionando los enfermos con criterios prefijados. Aplica una metodología sistemática y uniforme y se ha ejecuta por un solo equipo investigador perteneciente a un único centro. Con todo, se han minimizado los sesgos inherentes a los estudios retrospectivos de las series más significativas publicadas hasta ahora (Joy et al. 1989; Reijnveld et al. 2001; Prella et al. 2002; Simmons et al. 2003; Fernandez et al. 2006; Dabby et al. 2006; Filosto et al. 2007; Malandrini et al. 2008). Pese a ello, aplicando la metodología clásica, basada en las recomendaciones del documento elaborado por un grupo de expertos de la EFNS (Kyriakides et al. 2010), se consigue un rendimiento relativamente bajo ya que apenas se consigue diagnosticar un 30 % de los enfermos.

Desde la divulgación de la mencionada guía de expertos (Kyriakides et al. 2010), apenas se han publicado algunas series de hiperCKemias cuyo tamaño es irrelevante y alguna revisión que no han aportado conceptos novedosos (Papadopoulos C et al. 2015; Gutiérrez-Rivas E et al. 2015; Snoeck M et al. 2015; Savarese M et al. 2015; Montagnese F et al. 2015; Dong M et

al. 2015; Fiorillo C et al. 2013; Silvestri NJ et al. 2013; Lilleng H et al. 2013). Precisamente este estudio contiene dos aspectos innovadores: 1) la introducción de la RM como instrumento de apoyo al diagnóstico y su uso como herramienta que puede predecir la evolución de los pacientes; y 2) la introducción del análisis de un extenso panel de genes responsables de distrofias de cinturas y miopatías miofibrilares que ha dado lugar a un incremento notable de casos diagnosticados. La repercusión de estas dos tecnologías es de tal magnitud que a la postre nos ha llevado a proponer una nueva estrategia o algoritmo diagnóstico que aumentará sensiblemente la tasa de casos diagnosticados y reducirá de forma drástica el número de biopsias musculares, que es un método invasivo y costoso.

También es necesario comentar las dificultades y sesgos más significativos inherentes al estudio. En primer lugar se debe señalar que el carácter propiamente prospectivo del estudio se inició realmente en 2010 aplicando sistemáticamente la guía EFNS (Kyriakides et al. 2010), introduciendo la gota seca para la detección de enfermedad de Pompe tardía y el uso sistemático del test MLPA del gen de la distrofina para detectar deleciones y duplicaciones. Lógicamente los casos de hiperCKemia en seguimiento sin diagnosticar se introdujeron como si fuesen casos nuevos, pero en realidad se trataba de casos “cribados” que incluso habían sido biopsiados y, lógicamente, contaminarían la “pureza epidemiológica de la serie”. Este pequeño desvío se corrigió integrando en la serie los casos que y estaban diagnosticados a partir del año 2000, lo que quiere decir que, en pureza, un porcentaje menor de la serie (aproximadamente 20%) es realmente retrospectiva.

Otras dificultades inherentes al estudio capaces de introducir algún sesgo de interpretación fue el cambio de estrategia respecto al uso sistemático de algunas pruebas no invasivas como la curva de ácido láctico, que se restringió, sobre todo aquellos casos que acudían con calambres e intolerancia en relación al ejercicio y que declinaron hacerse la biopsia. O por el contrario, ampliar el espectro de peticiones de MLPA recomendadas por la EFNS cuando ya el estudio discurría a la mitad de su curso, con la idea de evitar un número innecesario de biopsias. El último sesgo que creemos relevante es que no se realizó sistemáticamente el estudio de algunos genes que de antemano se conoce que son causantes de hiperCKemia aislada como son los relacionados con miopatías congénitas, la DM2 y otras canalopatías. Este es un tema que se deberá abordar en el futuro con el diseño de un nuevo panel de estudio de HiperCKemias que amplíe el número de genes a otros no incluidos en las distrofias de cinturas y miopatías miofibrilares

Si analizamos los resultados respecto a los objetivos planteados, vemos que el primer objetivo, el perfil clínico de los pacientes, vemos que efectivamente existen grupos bien definidos con perfiles que los caracterizan, destacando que la HCK es más prevalente en hombres de edad adulta; y que los casos paucisintomáticos mayoritariamente se presentan con mialgias-calambres; un notable porcentaje de las HCK son familiares y que otro grupo relevante son los que se presentan como hiperCKemia mantenida tras la retirada de las estatinas. Estos perfiles ya se habían señalado en diversas publicaciones anteriores (Joy et al. 1989; Reijnveld et al. 2001; PELLE et al. 2002; Simmons et al. 2003; Fernandez et al. 2006; Dabby et al. 2006; Filosto



et al. 2007; Malandrini et al. 2008; Fiorillo C et al. 2013; Silvestri NJ et al. 2013; Lilleng H et al. 2013).

El segundo objetivo analiza la sensibilidad del MLPA y DBS para enfermedad de Pompe como pruebas no invasivas previas a la biopsia. La prueba de DBS la consideramos importante para aquellos centros que no dispongan del estudio de paneles de genes, ya que en nuestro caso al tener el gen GAA incluido en el panel hace innecesaria la realización de esta prueba; pero queda claro que debe estudiarse dados los casos detectados en la población de HCK (Gutiérrez-Rivas E et al. 2015; Montagnese F et al. 2015).

El estudio de MPLA al principio fue dirigido por la biopsia cuando mostraba déficit de distrofina, haciéndose como fase previa a la secuenciación, dado que la mayoría de mutaciones en el gen de la distrofina se deben a deleciones o duplicaciones, lo que supone un ahorro ya que esta prueba es más económica que la secuenciación del gen y además es más rápida. En el año 2013 tras un análisis intermedio de datos se modificó la estrategia y se incluyó el estudio de MLPA en la fase previa a la biopsia en varones menores de 20 años y en mujeres, dado que la frecuencia de distrofinopatías expresadas como HCK era la más alta. Tras el estudio final consideramos que es una prueba que debería hacerse a todos los casos independientemente de la edad, el sexo y nivel de CK; pero en orden de prioridad se situaría un puesto detrás del estudio de paneles de genes, ya que las distrofias de cinturas, en conjunto, son más prevalentes en la población de HCK que las distrofinopatías.

Al final no realizamos la curva de ac. láctico debido a los resultados obtenidos en primera instancia donde detectamos problemas en la técnica utilizada. Pero creemos que merece la pena incluirlo previo a la biopsia, ya que así descartaríamos los casos de McArdle sin necesidad de probar la miofosforilasa en la biopsia. Para ello en un futuro revisaremos la técnica y se pondrá a punto según los métodos estándar.

En el objetivo tres, ponemos a prueba el EMG y la RM como elementos diagnósticos en las HCK. En estudios previos se dice que el EMG es muy útil para el diagnóstico (Kokotis P, 2015), nosotros comprobamos que es una prueba poco sensible pero que puede ser útil en casos de afectación neurógena o cuando aparecen signos de hiperactividad. Aunque no lo descartamos como prueba de estudio previa a la biopsia dentro del algoritmo diagnóstico.

En cuanto a la RM, no hay publicaciones previas sobre esta materia, nosotros hacemos un amplio estudio de RM en 144 casos. Se comprueba que si bien no aporta datos específicos para el diagnóstico, resulta una herramienta indispensable para el seguimiento de los pacientes, ya que puede hacer un seguimiento cercano de las formas presintomáticas y tardías, o que dentro de los diferentes grupos de diagnósticos puede ofrecer un perfil y predecir la evolución de los pacientes.

En el objetivo 4, analizamos el rendimiento de la biopsia para el diagnóstico de las HCK. Los análisis de la morfología, marcadores inflamatorios, proteínas y enzimas arrojan un porcentaje de diagnósticos que

coinciden con datos referidos en la literatura (Joy et al. 1989; Reijnveld et al. 2001; Prella et al. 2002; Simmons et al. 2003; Fernandez et al. 2006; Dabby et al. 2006; Filosto et al. 2007; Malandrini et al. 2008; Kyriakides et al. 2010; Fiorillo C et al. 2013; Silvestri NJ et al. 2013; Lilleng H et al. 2013). La mayoría de las alteraciones morfológicas son inespecíficas y no ayudan a dar un diagnóstico concreto, pero esas alteraciones indican que algo está sucediendo en el musculo y es la causa de esa elevación de la CK en sangre, ya que detectamos alteraciones en el 96% de los casos estudiados.

Con el estudio clásico algunas mutaciones genéticas solo se llegan a estudiar cuando se conocen los antecedentes familiares, ya que carecían de marcadores proteicos o morfológicos en el momento del estudio para entrar en la sistemática, como el caso del ANO5 y la RYR; y en otros casos dichos marcadores no se han probado, como son las proteínas miofibrilares, ya que no fueron introducidos en la sistemática porque solo había publicado algún caso anecdótico. Esto es un sesgo en el estudio clásico, ya que al aplicar posteriormente el panel de genes, vemos un elevado de porcentaje de pacientes con mutaciones en estas proteínas. En cuanto al estudio de proteínas incluidas en la sistemática, después de estudiarlas mediante diferentes técnicas en la biopsia concluimos que lo más efectivo es realizar el estudio mediante inmunofluorescencia en todas, incluso en los marcadores inflamatorios, dejando solo excluido el caso de la calpaina que debe realizarse mediante inmunotransferencia y teniendo en cuenta que es secundaria a la mayoría de patologías musculares, con lo que su estudio en la biopsia muscular debería realizarse en ultimo termino así se evitara hacer el estudio

en muchos casos y secuenciar casos donde el déficit de calpaina es secundario.

Todo esto es aplicable al algoritmo clásico de estudio de la HCK, pero queda descartado con la información que aporta el panel de genes, ya que relega el estudio de biopsia al ultimo escalón del algoritmo y donde el estudio de proteínas en la biopsia quedaría excluido a casos concretos de nuevos marcadores de genes no incluidos en el panel previo y para confirmar patogenicidad de mutaciones no descritas. Ante esto, para el estudio de las HCK el análisis de la biopsia muscular queda exclusivamente para análisis morfológico (incluido ultraestructura, según casos) y marcadores inflamatorios, al contrario de los demás estudios donde la herramienta fundamental para el diagnóstico es la biopsia muscular (Joy et al. 1989; Reijnveld et al. 2001; Prella et al. 2002; Simmons et al. 2003; Fernandez et al. 2006; Dabby et al. 2006; Filosto et al. 2007; Malandrini et al. 2008; Fiorillo C et al. 2013; Silvestri NJ et al. 2013; Lilleng H et al. 2013).

En el quinto objetivo es donde realmente cambia todo el planteamiento del estudio realizado. En primer lugar aplicamos el método clásico que indica la bibliografía (déficit proteína-análisis genético) (Joy et al. 1989; Reijnveld et al. 2001; Prella et al. 2002; Simmons et al. 2003; Fernandez et al. 2006; Dabby et al. 2006; Filosto et al. 2007; Malandrini et al. 2008; Kyriakides et al. 2010), de esta manera alcanzamos aproximadamente el mismo rendimiento diagnóstico que los estudios clásicos, pero conlleva un gasto elevado dado que conlleva el coste del análisis proteico en la biopsia y

un posterior coste del análisis genético, además de que implica una biopsia previa en el paciente.

Tras este primer paso decidimos incluir en el estudio las nuevas metodologías de secuenciación masiva en aquellos pacientes que no hemos diagnosticado y elevamos un 10% el rendimiento diagnóstico. Debido a que solo se necesita sangre del paciente para obtener el ADN y se analizan de manera masivas diversos genes implicados en distrofias musculares aumentando el rendimiento diagnóstico de una forma no cruenta y económica, consideramos que la aplicación de estos paneles como estudio previo a la biopsia es indispensable ya que ahorra costes y aumenta el rendimiento, cambiando radicalmente el planteamiento del estudio de las HCK.

En el objetivo 6 planteamos cómo evolucionan durante el seguimiento los casos de HCK, hasta la fecha no hemos encontrado literatura relacionada con la evolución de la HCK, por lo que es una información novedosa que aporta el presente estudio.

En los casos de HCK aproximadamente el 30% de los casos que comienzan asintomáticos, permanecen como tal; y solo un 20% de los casos evolucionan desarrollando una sintomatología clara y debilidad, estas formas corresponden de forma mayoritaria a casos presintomáticos de diferentes miopatías, sobre todo de calpainopatías, pompe, casos neurógenos y algunas distrofinopatías.

Las formas paucisintomáticas permanecen mayoritariamente como al inicio aumentando ligeramente el número de casos con mialgias-calambres y/o intolerancia al ejercicio. La mayoría de HCK paucisintomáticas corresponden a casos de portadores de mutaciones recesivas, los cuales no desarrollan la enfermedad pero que se expresan como HCK con síntomas menores que permanecen durante su evolución. Pero otras corresponden a formas benignas que son de sumo interés estudiarlos como modelo para el diseño de nuevas terapias y análisis de biomarcadores, un ejemplo de ello son las distrofinopatías benignas que pueden ser de interés para el desarrollo de estrategias de skipping, ya que mayoritariamente estas formas benignas vemos que son causadas por la gran delección 45-55 del gen de la distrofina como indican algunos estudios (Taglia et al. 2015).

La conclusión final queda resumida en el objetivo 7, en el cual queda resumido el análisis de los diagnósticos obtenidos. Gracias a ese resumen se elaboran, analizando los diferentes factores, por un lado un modelo que indica por paciente la probabilidad de alcanzar un diagnóstico y por otro elaborar un nuevo algoritmo diagnóstico que replantea de nuevo el abordaje de la HCK desde un nuevo punto de vista que cambia el concepto de utilizar la biopsia muscular como prueba estándar para el estudio de las HCK (Kyriakides et al. 2010). En este punto además cabe destacar que un 28% de los pacientes diagnosticados presentaban unos niveles de CK entre 250-500 UI/L, este porcentaje replantea también el nivel de CK a partir del cual consideramos las HCK para estudio. En contra de lo que indica la guía EFNS (Kyriakides et al. 2010) si es importante estudiar a pacientes con estos niveles de CK, ya que aumenta la sensibilidad diagnóstica y no sesga la población de HCK.

Después del estudio de la amplia serie confirmamos la hipótesis de que la HiperCKemia asintomática o paucisintomática obedece a miopatías causadas por mutaciones en genes y en menor medida a otras causas y que se expresan principalmente como afecciones benignas o presintomáticas.

## 6.2 CONCLUSIONES

1. El perfil clínico mayoritario de pacientes estudiados con HCK son varones mayores de 20 años que presentan mialgias-calambres e intolerancia al ejercicio. También existe un grupo relevante relacionado con la toma de estatinas y otro importante con antecedentes familiares.
2. La prueba DBS deberá realizarse sistemáticamente antes de la biopsia muscular en caso de no disponer de un panel de genes que incluya el gen GAA.
3. El MLPA del gen de la distrofina deberá realizarse también en fase previa a la biopsia en todos los casos sin exclusión de sexo, nivel de CK o edad. Puede estar precedida del estudio con panel de genes si se dispone de este.
4. El EMG tiene una baja sensibilidad para el diagnóstico pero es orientador de las causas exógenas y de síndromes de hiperactividad.
5. La RM carece de especificidad para el diagnóstico, pero es útil en el seguimiento y evolución ya que tiene un alto valor predictivo.



6. La biopsia muscular muestra alteraciones en el 96% de los casos, aunque la mayoría son inespecíficas.
7. El análisis de proteínas musculares debe realizarse mediante inmunofluorescencia. El orden recomendado es distrofina, disferlina, caveolina, lamina, sarcoglicanos, distroglicano y merosina, dejando en último lugar el estudio de calpaina que se realizará mediante inmunotransferencia
8. Del análisis preliminar del estudio de HCK con panel de genes se deduce que este método se puede convertir en el primer escalón en la secuencia de pruebas necesarias para investigarla. El método clásico (déficit proteico-secuenciación) quedará obsoleto.
9. La evolución a largo plazo de los casos de HCK demuestra que un 27% permanece asintomático y un 54% continúa o se transforma en paucisintomáticos. El reconocimiento de estas formas tiene gran valor pues pueden servir de modelo para el diseño de nuevas terapias y el análisis de biomarcadores biológicos.

10. Un 19% de los pacientes representan formas presintomáticas que evolucionan a distrofias de cinturas, enfermedad de Pompe o afecciones neurógenas.
11. Se deben incluir en el protocolo de estudio de las HCK los pacientes con niveles de CK entre 250 – 500 UI/L ya que un 28% de los pacientes diagnosticados tenían unos niveles de CK en este rango.
12. En base a los resultados obtenidos en este estudio presentamos un nuevo algoritmo diagnóstico que simplifica el diagnóstico de las HCK y aumenta el rendimiento diagnóstico a la vez que economiza el proceso.



### 6.3 CONCLUSIONS

1. The major clinical profile of patients studied with HCK are men over 20 who have myalgia-cramps and / or exercise intolerance. There is also a significant group linked with taking statins and other important with family history.
2. The DBS test should be conducted systematically before muscle biopsy in case of unavailability of a panel of genes that includes the GAA gene.
3. The MLPA of dystrophin gene must also take place in pre-biopsy in all cases without excluding sex, age or level of CK. It may be preceded by the study of genes panel if you have this.
4. EMG has low sensitivity for the diagnosis but is guiding in exogenous causes or hyperactivity syndromes.
5. The RM lacks specificity for diagnosis, but is useful in monitoring and evolution as it has a high predictive value.
6. Muscle biopsy shows changes in 96% of cases, although most are nonspecific.

7. The analysis of muscle proteins must be done by immunofluorescence. The recommended order is dystrophin, dysferlin, caveolin, laminated, sarcoglycans, dystroglycan and merosin, leaving last calpain study to be conducted by immunoblotting
8. The preliminary analysis in HCK study of the genes panel, shows that this method can become the first step in the sequence of tests needed to investigate the HCK. The classical method (protein-sequencing deficit) will become obsolete.
9. The long-term cases of HCK show that 27% remained asymptomatic and 54% continues or becomes paucisymptomatic. The recognition of these forms is highly valued because they can serve as a model for designing new therapies and biological analysis of biomarkers.
10. 19% of the patients represent presymptomatic forms that evolve Limb Girdle Muscular Dystrophy, Pompe disease and neurogenic disorders.
11. It should be included in the study protocol of patients with CK levels between 250-500 IU / L, because 28% of the diagnosed patients had CK levels in this range.

12. Based on the results obtained in this study we present a new diagnosis algorithm which simplifies the diagnosis of HCK and increases diagnosis performance while economizing the process.



## **7 BIBLIOGRAFÍA**





1. Alias, L. *et al.* A novel mutation in the caveolin-3 gene causing familial isolated hyperCKaemia. *Neuromuscul. Disord.* **14**, 321–324 (2004).
2. Angelini, C. *et al.* Homozygous alpha-sarcoglycan mutation in two siblings: one asymptomatic and one steroid-responsive mild limb-girdle muscular dystrophy patient. *Muscle Nerve* **21**, 769–775 (1998).
3. Apple, F. S., Quist, H. E., Doyle, P. J., Otto, A. P. & Murakami, M. M. Plasma 99th percentile reference limits for cardiac troponin and creatine kinase MB mass for use with European Society of Cardiology/American College of Cardiology consensus recommendations. *Clin. Chem.* **49**, 1331–1336 (2003).
4. Boito, C. A. *et al.* Clinical and molecular characterization of patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Arch. Neurol.* **62**, 1894–1899 (2005).
5. Brancaccio, P., Maffulli, N. & Limongelli, F. M. Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br. Med. Bull.* **81-82**, 209–230 (2007).
6. Brewster, L. M., Mairuhu, G., Sturk, A. & van Montfrans, G. A. Distribution of creatine kinase in the general population: implications for statin therapy. *Am. Heart J.* **154**, 655–661 (2007).
7. Brewster, L. M. & de Visser, M. Persistent hyperCKemia: fourteen patients studied in retrospect. *Acta Neurol. Scand.* **77**, 60–63 (1988).

8. Capasso, M. *et al.* Familial idiopathic hyper-CK-emia: an underrecognized condition. *Muscle Nerve* **33**, 760–765 (2006).
9. Carbone, I. *et al.* Mutation in the CAV3 gene causes partial caveolin-3 deficiency and hyperCKemia. *Neurology* **54**, 1373–1376 (2000).
10. Chamoles, N. A., Niizawa, G., Blanco, M., Gaggioli, D. & Casentini, C. Glycogen storage disease type II: enzymatic screening in dried blood spots on filter paper. *Clin. Chim. Acta* **347**, 97–102 (2004).
11. Chiba, Y. *et al.* [Two sisters with dysferlinopathy manifesting different clinical phenotypes]. *Rinsho Shinkeigaku* **43**, 188–191 (2003).
12. Comi, G. P. *et al.* Clinical variability in Becker muscular dystrophy. Genetic, biochemical and immunohistochemical correlates. *Brain* **117** ( Pt **1**), 1–14 (1994).
13. Dabby, R. *et al.* Asymptomatic or minimally symptomatic hyperCKemia: histopathologic correlates. *Isr. Med. Assoc. J.* **8**, 110–113 (2006).
14. Dong, M. *et al.* DAG1 mutations associated with asymptomatic hyperCKemia and hypoglycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan. *Neurology* **84**, 273–279 (2015).
15. Dubowitz, V., Sewry, C. A., Oldfors, A. & Lane, R. J. M. *Muscle Biopsy: A Practical Approach, Expert Consult; Online and Print, 4: Muscle Biopsy: A Practical Approach.* (Elsevier Health Sciences, 2013).

16. Fanin, M. & Angelini, C. Muscle pathology in dysferlin deficiency. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **28**, 461–470 (2002).
17. Fanin, M. *et al.* Frequency of LGMD gene mutations in Italian patients with distinct clinical phenotypes. *Neurology* **72**, 1432–1435 (2009).
18. Feld, R. D. & Witte, D. L. Presence of creatine kinase BB isoenzyme in some patients with prostatic carcinoma. *Clin. Chem.* **23**, 1930–1932 (1977).
19. Fernandez, C. *et al.* Diagnostic evaluation of clinically normal subjects with chronic hyperCKemia. *Neurology* **66**, 1585–1587 (2006).
20. Fiege, M. *et al.* Results of contracture tests with halothane, caffeine, and ryanodine depend on different malignant hyperthermia-associated ryanodine receptor gene mutations. *Anesthesiology* **97**, 345–350 (2002).
21. Filosto, M. *et al.* The role of muscle biopsy in investigating isolated muscle pain. *Neurology* **68**, 181–186 (2007).
22. Fiorillo, C. *et al.* Novel mutations in the fukutin gene in a boy with asymptomatic hyperCKemia. *Neuromuscul. Disord.* **23**, 1010–1015 (2013).
23. Fischer, D. *et al.* Consequences of a novel caveolin-3 mutation in a large German family. *Ann. Neurol.* **53**, 233–241 (2003).

24. Galassi, G., Rowland, L. P., Hays, A. P., Hopkins, L. C. & DiMauro, S. High serum levels of creatine kinase: asymptomatic prelude to distal myopathy. *Muscle Nerve* **10**, 346–350 (1987).
25. Goldstein, J. L. *et al.* Screening for Pompe disease using a rapid dried blood spot method: experience of a clinical diagnostic laboratory. *Muscle Nerve* **40**, 32–36 (2009).
26. Gutiérrez-Rivas, E. *et al.* Targeted screening for the detection of Pompe disease in patients with unclassified limb-girdle muscular dystrophy or asymptomatic hyperCKemia using dried blood: A Spanish cohort. *Neuromuscul. Disord.* **25**, 548–553 (2015).
27. Hanisch, F. *et al.* Frequency of calpain-3 c.550delA mutation in limb girdle muscular dystrophy type 2 and isolated hyperCKemia in German patients. *Clin. Neuropathol.* **26**, 157–163 (2007).
28. Hekimsoy, Z. & Oktem, I. K. Serum creatine kinase levels in overt and subclinical hypothyroidism. *Endocr. Res.* **31**, 171–175 (2005).
29. Hoffman, E. P. & Clemens, P. R. HyperCKemic, proximal muscular dystrophies and the dystrophin membrane cytoskeleton, including dystrophinopathies, sarcoglycanopathies, and merosinopathies. *Curr Opin Rheumatol* **8**, 528–538 (1996).

30. Joy, J. L. & Oh, S. J. Asymptomatic hyper-CK-emia: an electrophysiologic and histopathologic study. *Muscle Nerve* **12**, 206–209 (1989).
31. Karpati, G., Hilton-Jones, D. & Griggs, R. C. *Disorders of Voluntary Muscle*. (Cambridge University Press, 2001).
32. Katiriji, B. & Al Jabeti, M. M. Creatine kinase revisited. *J Clin Neuromuscul Dis* **2**, 158–164 (2001).
33. Khaleeli, A. A., Griffith, D. G. & Edwards, R. H. The clinical presentation of hypothyroid myopathy and its relationship to abnormalities in structure and function of skeletal muscle. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **19**, 365–376 (1983).
34. Kleppe, B., Reimers, C. D., Altmann, C. & Pongratz, D. E. [Findings in 100 patients with idiopathic increase in serum creatine kinase activity]. *Med. Klin. (Munich)* **90**, 623–627 (1995).
35. Kyriakides, T. *et al.* EFNS guidelines on the diagnostic approach to pauci- or asymptomatic hyperCKemia. *Eur. J. Neurol.* **17**, 767–773 (2010).
36. Lane, R. J. & Roses, A. D. Variation of serum creatine kinase levels with age in normal females: implications for genetic counselling in Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Chim. Acta* **113**, 75–86 (1981).
37. Li, Y. *et al.* Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin. Chem.* **50**, 1785–1796 (2004).

38. Lilleng, H. et al. Clinical impact of persistent hyperCKemia in a Norwegian general population: a case-control study. *Neuromuscul. Disord.* **NMD 23**, 29–35 (2013).
39. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
40. Malandrini, A. et al. Muscle biopsy and in vitro contracture test in subjects with idiopathic HyperCKemia. *Anesthesiology* **109**, 625–628 (2008).
41. Mazzone, E. et al. Functional changes in Duchenne muscular dystrophy: a 12-month longitudinal cohort study. *Neurology* **77**, 250–256 (2011).
42. Mazzone, E. S. et al. 24 month longitudinal data in ambulant boys with Duchenne muscular dystrophy. *PLoS ONE* **8**, e52512 (2013).
43. Mazzone, E. S. et al. Reliability of the North Star Ambulatory Assessment in a multicentric setting. *Neuromuscul. Disord.* **19**, 458–461 (2009).
44. McDonald, C. M. et al. The 6-minute walk test and other endpoints in Duchenne muscular dystrophy: longitudinal natural history observations over 48 weeks from a multicenter study. *Muscle Nerve* **48**, 343–356 (2013).

45. Merlini, L. *et al.* Familial isolated hyperCKaemia associated with a new mutation in the caveolin-3 (CAV-3) gene. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **73**, 65–67 (2002).
46. Milone, M., Liewluck, T., Winder, T. L. & Pianosi, P. T. Amyloidosis and exercise intolerance in ANO5 muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **22**, 13–15 (2012).
47. Montagnese, F. *et al.* Clinical and molecular aspects of 30 patients with late-onset Pompe disease (LOPD): unusual features and response to treatment. *J. Neurol.* **262**, 968–978 (2015).
48. Morandi, L. *et al.* High plasma creatine kinase: review of the literature and proposal for a diagnostic algorithm. *Neurol. Sci.* **27**, 303–311 (2006).
49. Musumeci, O. *et al.* Asymptomatic hyperCKemia in a case of Danon disease due to a missense mutation in Lamp-2 gene. *Neuromuscul. Disord.* **15**, 409–411 (2005).
50. Neal, R. C., Ferdinand, K. C., Ycas, J. & Miller, E. Relationship of ethnic origin, gender, and age to blood creatine kinase levels. *Am. J. Med.* **122**, 73–78 (2009).
51. Noakes, T. D. Effect of exercise on serum enzyme activities in humans. *Sports Med* **4**, 245–267 (1987).



- 
52. Núñez Gil, I. J. *et al.* [Acute viral myositis in the adult]. *An Med Interna* **23**, 98 (2006).
53. Okinaka, S. *et al.* Serum creatine phosphokinase and aldolase activity in neuromuscular disorders. *Trans Am Neurol Assoc* **84**, 62–64 (1959).
54. Paasuke, R. T. & Brownell, A. K. Serum creatine kinase level as a screening test for susceptibility to malignant hyperthermia. *JAMA* **255**, 769–771 (1986).
55. Papadopoulos, C. *et al.* Caveolinopathies in Greece. *Neurologist* **20**, 8–12 (2015).
56. Penttilä, S. *et al.* Eight new mutations and the expanding phenotype variability in muscular dystrophy caused by ANO5. *Neurology* **78**, 897–903 (2012).
57. Pompe Disease Diagnostic Working Group *et al.* Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: report from an international consensus meeting. *Mol. Genet. Metab.* **93**, 275–281 (2008).
58. Prelle, A. *et al.* Asymptomatic familial hyperCKemia associated with desmin accumulation in skeletal muscle. *J. Neurol. Sci.* **140**, 132–136 (1996).

- 
59. Prelle, A. *et al.* Retrospective study of a large population of patients with asymptomatic or minimally symptomatic raised serum creatine kinase levels. *J. Neurol.* **249**, 305–311 (2002).
  60. Reijneveld, J. C., Notermans, N. C., Linssen, W. H., Bär, P. R. & Wokke, J. H. Hyper-CK-aemia revisited. *Neuromuscul. Disord.* **11**, 163–164 (2001).
  61. Reijneveld, J. C., Notermans, N. C., Linssen, W. H. & Wokke, J. H. Benign prognosis in idiopathic hyper-CK-emia. *Muscle Nerve* **23**, 575–579 (2000).
  62. Ropper, A. H. & Shahani, B. T. Pain in Guillain-Barré syndrome. *Arch. Neurol.* **41**, 511–514 (1984).
  63. Rowland, L. P., Osnos, M. & Hirschberg, E. Serum enzymes in the myopathies. *Trans Am Neurol Assoc* **85**, 15–18 (1960).
  64. Rowland, L. P. & Ross, G. Serum aldolase in muscular dystrophies, neuromuscular disorders, and wasting of skeletal muscle. *AMA Arch Neurol Psychiatry* **80**, 157–161 (1958).
  65. Rowland LP, Willner J, DiMauro S & Miranda A. Approaches to the membrane theory of Duchenne muscular dystrophy. *Excerpta Medica* 3–13 (1980).

66. Rudnik-Schöneborn, S. *et al.* Analysis of creatine kinase activity in 504 patients with proximal spinal muscular atrophy types I-III from the point of view of progression and severity. *Eur. Neurol.* **39**, 154–162 (1998).
67. Savarese, M. *et al.* Next generation sequencing on patients with LGMD and nonspecific myopathies: Findings associated with ANO5 mutations. *Neuromuscul. Disord.* **25**, 533–541 (2015).
68. Schapira, G., Dreyfus, J. C. & Schapira, F. [Elevation of the serum aldolase level; biochemical test in myopathy]. *Sem Hop* **29**, 1917–1920 (1953).
69. Schessl, J., Kress, W. & Schoser, B. Novel ANO5 mutations causing hyper-CK-emia, limb girdle muscular weakness and Miyoshi type of muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **45**, 740–742 (2012).
70. Serratrice, G., Pellissier, J.-F., N'Guyen, V., Attarian, S. & Pouget, J. [Dysferlinopathy. Example of a new myopathy]. *Bull. Acad. Natl. Med.* **186**, 1025–1032; discussion 1033–1034 (2002).
71. Shane, E., McClane, K. A., Olarte, M. R. & Bilezikian, J. P. Hypoparathyroidism and elevated muscle enzymes. *Neurology* **30**, 192–195 (1980).

72. Sherwood, R. A., Lambert, A., Newham, D. J., Wassif, W. S. & Peters, T. J. The effect of eccentric exercise on serum creatine kinase activity in different ethnic groups. *Ann. Clin. Biochem.* **33 ( Pt 4)**, 324–329 (1996).
73. Silvestri, N. J. & Wolfe, G. I. Asymptomatic/pauci-symptomatic creatine kinase elevations (hyperckemia). *Muscle Nerve* **47**, 805–815 (2013).
74. Simmons, Z., Peterlin, B. L., Boyer, P. J. & Towfighi, J. Muscle biopsy in the evaluation of patients with modestly elevated creatine kinase levels. *Muscle Nerve* **27**, 242–244 (2003).
75. Spada, M. *et al.* Screening for later-onset Pompe's disease in patients with paucisymptomatic hyperCKemia. *Mol. Genet. Metab.* **109**, 171–173 (2013).
76. Sundaram, M. *et al.* Ethnic variation in certain hematological and biochemical reference intervals in a south Indian healthy adult population. *Eur. J. Intern. Med.* **19**, 46–50 (2008).
77. Sunohara, N., Takagi, A., Nonaka, I., Sugita, H. & Satoyoshi, E. Idiopathic hyperCKemia. *Neurology* **34**, 544–547 (1984).
78. Taglia, A. *et al.* Clinical features of patients with dystrophinopathy sharing the 45-55 exon deletion of DMD gene. *Acta Myol* **34**, 9–13 (2015).

79. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**, 145–149 (1992).
80. Vainzof, M. & Zatz, M. Protein defects in neuromuscular diseases. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36**, 543–555 (2003).
81. Walker, R. H., Peters, J. J., Jung, H. H. & Danek, A. Diagnostic evaluation of clinically normal subjects with chronic hyperCKemia. *Neurology* **68**, 535; author reply 535–536 (2007).
82. Waring, W. P., Davidoff, G. & Werner, R. Serum creatine kinase in the post-polio population. *Am J Phys Med Rehabil* **68**, 86–90 (1989).
83. Weglinski, M. R., Wedel, D. J. & Engel, A. G. Malignant hyperthermia testing in patients with persistently increased serum creatine kinase levels. *Anesth. Analg.* **84**, 1038–1041 (1997).

## **8 ANEXOS**

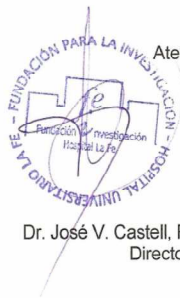




**Fundación para la Investigación  
Hospital La Fe**

Dr. José Vicente Castell Ripoll, en mi condición de Director General de la Fundación para la Investigación del Hospital La Fe de Valencia del Centro de trabajo en el que se desarrollará la investigación a que esta solicitud se refiere, CERTIFICO que d. Juan Jesús Vílchez padilla Doctor en Medicina; Dr. Luis Bataller Doctor en Medicina; Dña. Teresa Sevilla Doctora en Medicina; Dña. Nuria Muelas; D. Fernando Mayordomo Doctor en Medicina; Dña. Inmaculada Azorin Doctora en Ciencias Biológicas. Bioquímica Clínica Y Médica; y Dña. M<sup>a</sup> Pilar Martí. forman parte de la plantilla de este Centro en calidad de médicos e investigadores y cuentan con la autorización pertinente para llevar a cabo el proyecto de investigación titulado: "ESTUDIO DE LA HIPERCKEMIA SINTOMÁTICA E IDIOPÁTICA E IDENTIFICACIÓN DEL RIESGO PARA DESARROLLAR HIPERTEMIA".

Valencia a 4 de Marzo de 2009.



Atentamente,

Dr. José V. Castell, PhD., MD.  
Director General

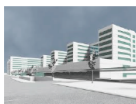
**Fundación para la Investigación Hospital La Fe.**

Avda. Campanar, 21. Escuela de Enfermería, 6ª planta, Despacho 619. 46009 Valencia.

Tel.: (+34) 96 1973313 – (+34) 961973328; Fax: +34 96 349 4416

E-mail: [fundacion\\_lafe@gva.es](mailto:fundacion_lafe@gva.es); web: <http://www.fundacionlafe.org>





## Hospital Universitario LA FE – Centro de Investigación

Director Dr. Juan Vilchez

**Laboratorio de Neurología Experimental.** Avenida de Campanar 21 CP: 46940

Valencia (España) Tel: (0034) 96 3862700 (ext 50183)

Fecha de biopsia ..... Numero de biopsia .....

Apellidos, Nombre .....

Fecha de nacimiento ..... Sexo H ☐ M ☐

Dirección .....

Población ..... CP ..... Tel .....

Hospital de Procedencia .....

Medico ..... Tipo musculo .....

Antecedentes familiares

.....  
 .....  
 .....

Síntomas

.....  
 .....  
 .....  
 .....

Exploración neurológica

.....  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....

Electromiografía

.....  
 .....

CPK ..... LDH ..... Ac.Lactico basal .....

Otros análisis .....

Sospecha diagnóstica .....

Consentimiento del paciente .....

NOMBRE:..... N°HC:.....

TIPO BIOPSIA:..... CODIGO:.....

BIOPSIA	NORMAL <input type="checkbox"/>	ANORMAL <input type="checkbox"/>	NO SIRVE <input type="checkbox"/>
	{	MUCHA <input type="checkbox"/>	MINIMA <input type="checkbox"/>
ANORMALIDAD		DIFUSA <input type="checkbox"/>	FOCAL <input type="checkbox"/>
		MIOPATICA <input type="checkbox"/>	NEUROPATICA <input type="checkbox"/>

	SI	NO	%	COMENTARIO
ARQUITECTURA FASCICULAR	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
GRASA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
VARIABILIDAD FORMAS FIBRAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
ATROFIA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
HIPERTROFIA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
HIPOTROFIA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
AGRUPAMIENTO FIBRAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
PREDOMINIO FIBRAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
NUCLEOS CENTRALES	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
CLUMPS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
FAGOCITOSIS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
NECROSIS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
REGENERACION	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
FIBRAS BASOFILAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
SPLITTING	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
VACUOLAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
VACUOLAS RIBETEADAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
NEMALINA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
REFUERZO SUBSARCOLEMICO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
FIBRAS ROJO ROTA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
AGREGADOS EN EL TRICROMO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
RED INTERMIOFIB ANORMAL	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
CENTRAL CORES	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....

	SI	NO	%	COMENTARIO
MINICORES	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
FIBRAS TARGETMOTH-EATEN	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
FIBRAS LOBULADAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
FIBRAS EN ANILLO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
AGREGADOS TUBULARES	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
ROD BODIES	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
COIL FIBRES	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
MASA SARCOPLASMICAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....
FIBRAS COX NEGATIVAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....	.....

	POSITIVO	NEGATIVO	COMENTARIO
MIOFOSFORILASA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....
AMILOIDE	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....

	NORMAL	ANORMAL	COMENTARIO
PAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....
VASOS SANGUÍNEOS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	.....

	COMENTARIO	
FIBROSIS	ENDOMISIAL <input type="checkbox"/>	PERIMISIAL <input type="checkbox"/>
	FOCAL <input type="checkbox"/>	IRREGULAR <input type="checkbox"/>

	%	COMENTARIO
INFILTRADOS	ENDOMISIAL <input type="checkbox"/>	.....
	PERIMISIAL <input type="checkbox"/>	.....
	PERIVASCULAR <input type="checkbox"/>	.....

PENDIENTE:.....  
.....  
.....  
.....

DIAGNOSTICO:.....  
.....  
.....  
.....

## Biopsia muscular

### 1. Identificación y descripción del procedimiento

Si usted presenta síntomas sugestivos de padecer una enfermedad muscular será necesario practicarle una biopsia muscular para intentar establecer el diagnóstico.

La biopsia muscular consiste en extraer una pequeña muestra de músculo para ser analizada con microscopia óptica y electrónica.

La biopsia se realiza con anestesia local, sin necesidad de ninguna preparación previa. Será realizada en un músculo del brazo (generalmente el deltoides) o de la pierna (gemelo).

El médico que le practique la biopsia le inyectará anestesia local en la zona que vaya a ser biopsiada. A continuación se le hará una incisión de unos tres centímetros para extraer la muestra. Una vez extraída se le colocarán unos puntos de sutura que serán retirados en aproximadamente 8 días.

### 2. Objetivo del procedimiento y beneficios que se esperan alcanzar

La muestra obtenida será utilizada para establecer el diagnóstico de su enfermedad muscular. Las miopatías son un grupo de enfermedades que afectan a los músculos de las extremidades y en algunos casos al corazón. Pueden presentarse en la infancia o en la edad adulta, tienen un curso progresivo, y en la mayoría de los casos no existe un tratamiento curativo. En algunas enfermedades musculares se conocen los genes responsables causantes de la enfermedad, pero en otros casos estas alteraciones se desconocen. Sin embargo, en la gran mayoría de enfermedades musculares se desconocen los mecanismos patogénicos que producen las lesiones en los músculos.

El diagnóstico de las enfermedades musculares se basa en el conjunto de datos clínicos, análisis de sangre y análisis de una biopsia muscular. La práctica de la biopsia muscular puede ser que permita establecer el diagnóstico de la enfermedad que usted padece, y poder darle un tratamiento en el caso de que se trate de una enfermedad tratable.

### 3. Alternativas razonables a dicho procedimiento

La alternativa a la participación es no autorizar que le sea practicada la biopsia muscular. En este caso, será imposible poder llegar al diagnóstico de su enfermedad.

Puede ocurrir que el resultado de la biopsia no permita establecer un diagnóstico preciso de la enfermedad que usted padece.

### 4. Consecuencias previsibles de su realización

La consecuencia previsible de su realización es la posibilidad de obtener el diagnóstico de su enfermedad muscular

### 5. Consecuencias previsibles de su no-realización

Si no se realiza el procedimiento podría ocurrir que no se obtuviese el diagnóstico de su enfermedad muscular

### 6. Riesgos frecuentes

El riesgo físico y molestia más frecuente de una biopsia muscular es el dolor menor.

### 7. Riesgos poco frecuentes

La infección de la herida (celulitis) es muy poco frecuente al realizarse en condiciones estériles. Otra complicación muy poco frecuente es el hematoma en el sitio de la biopsia, apareciendo con mayor frecuencia en pacientes con enfermedades hematológicas o tratados con fármacos anticoagulantes, o el desvanecimiento.

### 8. Riesgos en función de la situación clínica del paciente

Otros riesgos o complicaciones que podrían aparecer, dada su situación clínica y sus circunstancias personales, son \_\_\_\_\_

En su actual estado clínico, los beneficios derivados de la realización de este procedimiento superan los posibles riesgos. Por este motivo se le indica la conveniencia de que le sea practicado. Si aparecieran complicaciones, el personal médico y de enfermería que le atiende está capacitado y dispone de los medios para tratar de resolverlas.

## Biopsia muscular

## 9. Declaración de consentimiento

Don/doña ..... de ..... años de edad, con domicilio en .....  
 , DNI ..... y nº de SIP .....

Don/doña ..... de ..... años de edad, con domicilio en .....  
 en calidad de (representante legal, familiar o allegado  
 de la paciente) ..... con DNI .....

Declaro:

Que el Doctor/a ..... me ha explicado que es conveniente/necesario, en mi  
 situación la realización de .....  
 y que he comprendido adecuadamente la información que me ha dado.

En ..... a ..... de ..... de 2 .....

Fdo.: Don / doña ..... DNI .....

Fdo.: Dr/a ..... DNI .....

Colegiado nº: .....

## 10. Revocación del consentimiento

Revoco el consentimiento prestado en fecha ..... de ..... de 2 ..... y no deseo proseguir  
 el tratamiento que doy con esta fecha por finalizado.

En ..... a ..... de ..... de 2 .....

Fdo. el médico

Fdo. el/la paciente

Colegiado nº: .....



### 1. Identificación y descripción del procedimiento

Se le propone un análisis genético para el estudio de \_\_\_\_\_  
(completar)

### 2. Objetivo y beneficios esperados

Los estudios genéticos pueden aportar información relevante para su salud o la de sus familiares. Su finalidad es detectar la existencia o no de determinadas alteraciones genéticas que pueden relacionarse con el diagnóstico, pronóstico o riesgo familiar de la enfermedad. Los resultados se evaluarán teniendo en cuenta los antecedentes clínicos personales y familiares, la exploración física, las pruebas complementarias y la interpretación clínica de los profesionales de la salud. Usted será informado de las repercusiones que tengan sobre el manejo de su enfermedad y si se demuestra que usted es portador de una variante genética patológica que puede ser heredada, y transmitida a la descendencia, se le ofrecerá recibir asesoramiento genético.

Puede negarse a realizarse el estudio genético y puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe. Para revocar este consentimiento puede dirigirse al mismo profesional de la salud con el que lo firmó.

### 3. Protección de datos personales y confidencialidad

Las muestras destinadas al análisis genético se analizarán en la Unidad de Genética del Hospital La Fe y se almacenarán en este laboratorio durante el tiempo necesario para el proceso de análisis. En el caso en el que los análisis genéticos se deban hacer fuera del Hospital La Fe, usted será informado.

Sus datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos informatizada cumpliendo con las garantías que establece la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal y la legislación sanitaria aplicable.

Los resultados de los análisis se almacenarán en el archivo del Hospital U i P La Fe. Los profesionales sanitarios del centro tendrán acceso a los datos que consten en su historia clínica si son pertinentes para la asistencia que le presten. El personal que acceda a los datos genéticos en el ejercicio de sus funciones quedará sujeto al deber de secreto de forma permanente.

Se le informará de los resultados, en la Unidad de Genética del Hospital La Fe o por el médico que solicitó el estudio. Tiene también derecho a que no se le informe de sus datos genéticos. La información es estrictamente personal, salvo que usted autorice expresamente a terceras personas. Si estos datos pueden afectar a algunos miembros de su familia dependerá de usted transmitirles dicha información.

### 4. Riesgos:

El procedimiento en sí no tiene más riesgos que el de un análisis habitual de sangre. Sin embargo, debe conocer:

**4.1 Limitaciones del estudio:** Debido a las limitaciones tecnológicas o de conocimiento es posible que no se identifique la alteración genética responsable de la enfermedad. Esto no quiere decir que la enfermedad que padece no tenga origen genético.

**4.2 Posibilidad de hallazgos inesperados:** Ocasionalmente pueden obtenerse resultados inesperados relacionados con otras patologías. En ese caso usted decidirá si quiere/no conocer dicha información y se le asesorará sobre su trascendencia.



## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL ANÁLISIS GENÉTICO

UGEM-M-3

REV03(5/2014)

UNIDAD  
DE  
GENÉTICA

### 5. Declaraciones y firmas

**Declaración del PROFESIONAL de salud:** He informado debidamente.

D./Dña.....NºColegiado.....

En .....a.....de.....de..... Firma:

### Declaración del PACIENTE:

Estoy satisfecho/a con la información recibida, se me ha informado verbalmente de los procedimientos de análisis genético a realizar, he podido hacer las preguntas que he estimado conveniente, a las que se ha respondido adecuadamente y comprendo el alcance del procedimiento, por lo que, OTORGO LIBRE Y VOLUNTARIAMENTE MI CONSENTIMIENTO PARA EL ANÁLISIS GENÉTICO.

Nombre del paciente:

DNI y/o SIP:

Nombre del representante del paciente:

*(en caso de minoría legal o incapacidad)*

DNI:

En.....a.....de.....de..... Firma:

RENUNCIO A SER INFORMADO DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO

☐

AUTORIZACIÓN PARA INFORMAR A TERCERAS PERSONAS

☐

AUTORIZO a que D./Dña.....  
con DNI..... y con teléfono..... pueda ser informada  
sobre los resultados e implicaciones del estudio

### REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

REVOCO el consentimiento prestado en fecha.....para la realización del estudio genético.

Nombre del paciente:

DNI y/o SIP:

Nombre del representante del paciente:

*(en caso de minoría legal o incapacidad)*

DNI:

En.....a.....de.....de..... Firma:

**TINCIÓNHEMATOXILINA-EOSINA:**

1. Atemperar las laminillas al menos 10´
2. Sumergir durante 3-4´ en Hematoxilina de Harris. Si es el primer uso hay que filtrarla.
3. Lavar con agua del grifo durante 1-2´
4. Sumergir 1´en solución acuosa al 1% de eosina (amarilla), a la cual añadimos una gota de ac.acético glacial y mezclamos bien, esta solución no se agita
5. Lavar con agua destilada
6. Deshidratar
7. Montar con Eukkit

**TINCIÓN PAS:**

1. Atemperar las laminillas al menos durante 10´
2. Fijar 10´ en Carnoy:
  - a. 300 mL etanol absoluto
  - b. 150 mL cloroformo
  - c. 50 mL ac.acetico glacial
3. Lavar con agua destilada 4-5 veces
4. Sumergir en solución acuosa 0,5% de ac.periodico (Merck 5240025) durante 5´
5. Lavar con agua destilada 2-3 veces
6. Sumergir en reactivo de Schiff (Merck 109033) durante 10-15´en oscuridad
7. Lavar con agua del grifo 5´
8. Contrastar núcleos sumergiendo en Hemetoxilina Harris 3-4´
9. Lavar con agua del grifo 3-4 veces
10. Deshidratar
11. Montar con Eukkit

**TINCIÓN TRICRÓMICO MODIFICADO DE ENGEL:**

1. Atemperar las laminillas al menos durante 10´
2. Sumergir durante 4-5´ en Hematoxilina de Harris. Si es el primer uso hay que filtrarla.
3. Lavar con agua del grifo 1-2´
4. Sumergir en Solución de tricromo durante 10-15´:

Solución tricromo, dura máx 15 días a TA (Filtrar en el primer uso)



- a. 300 mg Fast Green FCF (sigma F-7252)
  - b. 600 mg Cromogeno 2R (sigma C-3143)
  - c. 600 mg Ácido fosfowolfrámico hidrato (Merk 583)
  - d. 100 mL agua destilada
  - e. 1 mL de ac.acético glacial
  - f. Ajustar el pH a 3,4 con NaON o HCl 0,1N
5. Diferenciar unos segundos agitando la laminilla en solución de ac.acético glacial 0,2% (1mL ac.acético glacial + 500 mL agua destilada). Fija el color
  6. Deshidratar
  7. Montar con Eukkit

#### ATPasa´s ACIDA (4.35) Y BASICA (9,4):

Solución madre  $\text{CaCl}_2$  0,18M  $\rightarrow$  6,615 g + 250 mL  $\text{H}_2\text{O}$ d (Merk 2083)  
Solución madre TRIS 1,5M  $\rightarrow$  45,43 g + 250 mL  $\text{H}_2\text{O}$ d (Sigma T1378)

- Solución lavado:  
12,1 g TRIS  
100 mL  $\text{CaCl}_2$  0,18M  
Enrasar hasta un litro de agua y ajustar pH a 7,8.
- 1%  $\text{CaCl}_2$ :  
5 g  $\text{CaCl}_2$  + 500 mL  $\text{H}_2\text{O}$ d
- 2% Cloruro Cobalto:  
10 g Cloruro Cobalto + 500 mL  $\text{H}_2\text{O}$ d
- Incubación básica:  
6,7 mL TRIS 1,5M  
10 mL  $\text{CaCl}_2$  0,18M  
Enrasar hasta 100 mL y ajustar pH a 10,4

- Solución fijadora:  
50 mL  $\text{CaCl}_2$  0,18M  
3 mL TRIS 1,5M  
Enrasar hasta 100 mL y ajustar pH a 9,3
- Incubación ácida:  
50 mL  $\text{CaCl}_2$  0,18M  
1,5 mL ac. Acético glacial  
Enrasar a 100 mL y ajustar pH a 4,35
- Incubación baño 37°C:  
6,7 mL TRIS 1,5M  
10 mL  $\text{CaCl}_2$  0,18M  
166 mg ATP (Sigma A5394)  
370 mg KCl  
Enrasar 100 mL y ajustar pH a 9,4
- Lavado final:  
160 mL  $\text{H}_2\text{O}$   
13,4 mL TRIS 1,5M  
Enrasar a 200 mL y ajustar pH a 9,4
- Solución acuosa de sulfuro de amonio al 1%:

#### TINCIÓN BÁSICA:

15' atemperar laminillas  
15' incubar en solución básica  
2x1' lavados  
5' solución fijadora  
2x1' lavados  
30' incubar en baño a 37°C  
2x30' 1%  $\text{CaCl}_2$   
3' cloruro cobalto  
5' agua grifo (varios cambios)

2x30 ´ ´ lavado final  
2 ´ sol.acuosa sulfuro de amonio al 1%  
5 ´ agua grifo  
Deshidratar (70-96-100-100-xilol) y montar con eukkit

### TINCIÓN ÁCIDA:

15 ´ atemperar laminillas  
20 ´ incubar en solución ácida  
2x1 ´ lavados  
30 ´ incubar en baño a 37°C (45 ´ mejor)  
2x30 ´ ´ 1% CaCl<sub>2</sub>  
3 ´ cloruro cobalto  
5 ´ agua grifo (varios cambios)  
2x30 ´ ´ lavado final  
2 ´ sol.acuosa sulfuro de amonio al 1%  
5 ´ agua grifo  
Deshidratar (70-96-100-100-xilol) y montar con eukkit.

### TINCIÓN MIOFOSFORILASA

1. Incubar 30-60 minutos a 37°C en la siguiente solución:
  - Buffer acetato 0.2M pH 5.6 → 10 mL.  
Acetato de sodio 0.1M (2.322g + 200 c.c de agua destilada) → 181 c.c  
Ac. Acético 0.1M (0.150125g + 25 c.c de agua destilada) → 19 c.c
  - AMP → 10 mg.
  - Glucosa -1- fosfato → 50 mg.
  - Fluoruro sódico 0.2M → 1.25 mL.  
0.84g + 100 c.c de agua destilada.
  - Insulina 400 → 1 gota.
  - Glucógeno → 1 mg.
  - Agua destilada → 6.25 mL.
  - Polivinil pirrolidona → 0.9 g.
  - pH = 5.7

2. Lavar con agua destilada.
3. Poner en una solución diluida de yoduro de lugol 2/10 (400 c.c de agua destilada + 8 c.c de lugol) durante 1 minuto.
4. Lavar con agua destilada.
5. Montar con glicerina.

#### TINCIÓN NADH-TR:

1. Atemperar las laminillas al menos durante 10´
2. Preparar o tener almacenado TRIS-HCL 0,2M:
  - o 12,11 g TRIS y ajustar el pH a 7,4 con HCL. Volumen final 500 mL
3. Preparar:
  - a. 25 mL TRIS-HCL 0,2M
  - b. 25 mL Agua destilada
  - c. 25 mg NBT (1,2 mM) Sigma N6876-1G
  - d. 25 mg NADH Sigma N-8129 (tapar bien con parafilm para que no entre humedad)
4. Incubar a 37°C 30-45´ tapado con parafilm.
5. Unos segundos ir sumergiendo en las siguientes soluciones de acetona: 30-60-90-60-30
6. Lavar con agua destilada
7. Montar con glicerina

#### TINCIÓN SDH:

1. Atemperar las laminillas al menos durante 10´
2. Preparar:
  - 20 mL agua destilada
  - 20 mg NBT (Sigma N6876-1G)
  - 10 mL succinato sódico 0,2M
  - 10 mL tampón fosfato 0,2M pH=7,6
3. Incubar a 37°C 1h30´ tapado con parafilm.
4. Pasar 2´ por solución fisiológica.
5. Fijar 5-10´ con formalina 10%
6. Lavar con agua
7. Unos segundos ir sumergiendo en las siguientes soluciones acuosas de acetona: 30-60-90-60-30%
8. Lavar con agua destilada
9. Montar con glicerina

**TINCIÓN COX:**

1. Atemperar las laminillas al menos durante 10´
2. Incubar las laminillas 1h a TA, en la siguiente solución preparada en el momento:
  - 18 Tampón fosfato
  - 2 mL solución catalasa 0,002% (2 mg en 100 mL)
  - 20 mg Citocromo C (SIGMA C-2506)
  - 10 mg DAB (SIGMA D-5637)
  - 1,5 g Sacarosa (MERK 1076687)
3. Lavar con agua destilada 2-3 veces
4. Deshidratar
5. Montar con Eukkit

**TINCIÓN MAD:**

1. Atemperar las laminillas al menos durante 10´
2. Preparar:
  - 24,67 mg DTT (3,2 mM) Sigma D-0632
  - 49,05 mg NBT (1,2 mM) Sigma N6876-1G
  - 745,6 mg KCl (0,2mM)
  - 20,83 mg AMP (1,2 mM) Sigma A1752-5G
  - Disolver en 40 mL de agua destilada y ajustar el pH a 6,1 y después enrasar a 50 mL de volumen final (pH inicial 5,4)
3. Incubar a 37°C 45-60´ tapado con parafilm.
4. Unos segundos ir sumergiendo en las siguientes soluciones de acetona: 30-60-90-60-30
5. Lavar con agua destilada
6. Montar con glicerina

**TINCIÓN OIL RED O (ORO):**

1. Atemperar las laminillas al menos durante 10´
2. Incubar las laminillas 30´ a TA (no pasa nada si es más tiempo) en la siguiente solución preparada en el momento:
  - 12 mL agua destilada
  - 18 mL stock saturado ORO (sigma O-0625) al 5% en isopropanol (Merck 109634)
3. Filtrar la solución

4. Sumergir unos segundos en solución acuosa de isopropanol al 60% agitando las laminillas
5. Lavar con agua destilada 2-3 veces
6. Contrastar núcleos sumergiendo en Hemetoxilina Harris 1-2´
7. Lavar con agua del grifo 3-4 veces
8. Poner las laminillas en vertical y dejar secar bien
9. Montar con glicerina

#### FOSFATASA ACIDA:

- T.ACETATO 0,14M pH=5:  
9,52 g acetato de sodio  
500 mL agua destilada  
Ajustar pH con ácido acético 0,1N
- 4% pararosanilina clorhidrato en HCl 2N (16,5%)
- 4% nitrato de sodio
- Verde de metilo 1% 0,2M en tampón acetato pH=4  
NOTA: con cloroformo separar verde, eliminando el violeta.

#### TINCION:

1. 25 mg Naphtol AS-B1 fosfato (sigma N2250) + 2,5 ml NN dimetil-formamida (Merck 103053). Tapar con parafilm porque es TÓXICO.
2. 30 mL agua destilada + 12,5 mL de T.acetato 0,14M
3. 2 mL Pararosalina + 2 mL nitrato de sodio (TÓXICO)
4. Mezclar las 3 soluciones y ajustar el pH entre 4,7-5 con NaOH 1N
5. Incubar las muestras en esta solución a 37°C entre 45-60 min,
6. Lavar 2-3 veces con agua destilada
7. Poner un minuto en verde de metilo
8. Lavar con abundante agua destilada o del grifo.
9. Montar con glicerina.

#### PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA:

1. Bloqueamos 15 minutos con PBS-BSA 1%.
2. Incubar con los Ac durante 1 hora, preparamos el Ac con PBS-BSA 1%:

- Merosina → 1:50
- Distrofina 1, 2 y 3 → 1:20
- $\alpha$  y  $\beta$  Sarcoglicano → 1:50
- Disferlina → 1:40
- Caveolina → 1:100
- Espectrina → 1:100

3. 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-BSA 1%.
4. Incubar con Biotina 30 minutos.
5. 2-3 lavados de 5 minutos con PBS-BSA 1%.
6. Incubar con Streptavidina durante 1 hora.
7. 2-3 lavados de 5 minutos con PBS-BSA 1%.
8. Revelar con DAB 7-10 minutos en oscuridad "Filtramos el DAB con jeringa".
9. Lavar con agua del grifo.
10. Deshidratar.
11. Montar.

#### PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA:

- Fijar con metanol 100% 5' en congelador.
- Bloqueo con PBS+BSA 1% 15' a temperatura ambiente.
- Incubar con Ac 1º 1h 30' a temperatura ambiente.
- 3 x 10' de lavados con PBS+BSA 1%.
- Incubar con Ac 2º con fluorocromo 1h a temperatura ambiente y oscuridad.
- Un lavado de 10' con PBS+BSA 1%.
- 2 x 10' de lavados con PBS.
- Montar con Vectashield

#### PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA INFLAMATORIAS:

- Fijar con acetona 10' en nevera.
- Bloqueo con PBS+BSA 1% 5' a temperatura ambiente.
- Incubar con Ac 1º 1h a 37º C.
- 3 x 10' de lavados con PBS+BSA 1%.
- Incubar con Ac 2º con fluorocromo y Ulex a temperatura ambiente y oscuridad.
- Un lavado de 10' con PBS+BSA 1%.
- 2 x 10' de lavados con PBS.
- Montar con Vectashield
-

**PROTOCOLO INCLUSIÓN EN ARALDITA:**

- Fijación:
  - 2,5M de Glutaraldeído en tampón cacodilato 0,1M pH=7,2
  - 3h a 4°C
- Lavados:
  - Tampón cacodilato 0,15M pH=7,2
  - Toda la noche a 4°C
- Post-fijación:
  - Osmio 1% en tampón cacodilato 0,1M a pH=7,2
  - 1h a 4°C
- Lavados:
  - Tampón cacodilato 0,15M pH=7,2
  - 3x5 min
- Deshidratar:
  - Alcohol 70° → 2x10 min
  - Alcohol 95° → 3x5 min
  - Alcohol 100° → 3x5 min
  - Óxido de propileno → 3x5 min
- Inclusión:
  - Epoxi/Óxido propileno → 1/1 → 3x15 min
  - Epoxi/Óxido propileno → 3/1 → 2x45 min
  - Epoxi/Óxido propileno → 15/1 → 2x45 min
- Polimerización:
  - Epoxi a 60°C durante 48h en los moldes



### EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE SANGRE:

#### 1. Preparación de muestras de sangre total:

TIPO DE MUESTRA	KIT	VOLUMEN	REQUISITO PREVIOS AL PROCEDIMIENTO
SANGRE TOTAL HUMANA	BLOOD DNA PURIFICATION SYSTEM (AS1015)	400 $\mu$ L	NINGUNO

Tabla 1. Volumen de la muestra de sangre total y requisitos previos.

#### Notas:

- Se pueden utilizar muestras de sangre total recogidas en tubos de tratados con EDTA, citrato o heparina.
- Las muestras de sangre deben almacenarse a 4 °C y deben procesarse en los 7 días posteriores a su extracción.

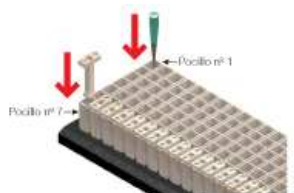
#### 2. Preparación de los cartuchos de Maxwell® 16:

Colocamos cada cartucho que vayamos a usar en la gradilla de cartuchos de Maxwell® 16 Cartridge Rack con el lado estriado mirando hacia el lado numerado de la gradilla. Quitamos con cuidado el precinto de los cartuchos.

En el Cartucho de Maxwell® 16 Blood DNA Purification Kit. La muestra la añadimos al pocillo número 1.



Colocamos un émbolo en el pocillo número 7 de cada cartucho, asegurándonos de que el fondo del émbolo llegue al fondo del cartucho. (El pocillo 7 es el más cercano al lado estriado del cartucho).



### 3. Proceso de extracción de DNA:

Transferimos los cartuchos que contienen las muestras y los émbolos de la gradilla de preparación de cartuchos a la plataforma de Maxwell® 16, asegurándonos de colocar los cartuchos en el instrumento con el lado estriado del cartucho más cercano a la puerta.

Luego colocamos un tubo de elución azul por cada cartucho en las ranuras para tubos de elución que hay en la plataforma. Añadimos 350 µL de tampón de elución a cada tubo de elución azul. Y ponemos en funcionamiento el aparato en el programa indicado para dicho kit.



A los 30´aproximadamente retiramos los tubos de elución de sus ranuras térmicas y los colocamos en la gradilla de tubos de elución magnética. Transferimos las muestras eluídas (aprox. 300 uL) a los tubos de almacenamiento con una pipeta y guardamos el DNA a -80°C.

### EXTRACCIÓN DNA A PARTIR DE MÚSCULO ESQUELÉTICO:

#### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

##### DILUTE WASH SOLUTION CONCENTRATE

Diluir el concentrado con 10 mL (10 KIT), 80 mL (70 KIT) o 360 mL (350 KIT) con etanol de 95–100%. Después de cada uso tapar bien para prevenir que se evapore el etanol.

### DISSOLVE PROTEINASE K IN WATER

Según la tabla 1 disolvemos el polvo de la proteinasa K con agua (Catalog No. W4502) hasta obtener un stock de 20 mg/mL. Esta solución dura varios días guardada a 2–8 °C. Para almacenar a largo plazo hacemos alícuotas y las guardamos a –20 °C.

Table 1. Proteinase K Solution Preparation

Catalog No.	Proteinase K (mg)	Water (mL)
G1N10	5	0.25
G1N70	10	0.5
G1N350	100	5.05

### PROTOCOLO EXTRACCIÓN:

#### 1. PREPARACIÓN DEL TEJIDO:

Hacemos 50 cortes aproximadamente de 20 um por cada muestra de manera que aproximadamente deben pesar 25 mg y los ponemos en un eppendorf de 1,5 mL.

#### 2. LISIS DEL TEJIDO:

- Añadimos al eppendorff 180 ul de Lysis T Solution.
- Añadimos al eppendorff 20 ul de Proteinasa K.
- Vortemos para mezclar bien.
- Incubamos a 55°C (termoblock en agitación) hasta que el tejido esté completamente disgregado y no queden partículas (unos 30´aprox), se puede ir sacando y agitando con el vortex de vez en cuando.
- Añadimos 20 ul de RNAasa A Solution e incubamos 2´a TA

#### 3. LISIS CELULAR:

- Añadimos 200 ul de Lysis C Solution
- Vorteamos unos 15´´, es muy importante mezclar bien.
- Incubamos a 70°C durante 10´

#### 4. PREPARACION DE LA COLUMNA:

- Añadimos 500 ul de Column Preparation Solution a la columna.
- Centrifugamos a 12.000 g durante 1´
- Desechamos el liquido.

Así maximizamos la unión del DNA a la membrana de la columna.

## 5. EXTRACCIÓN DNA:

- Añadimos al lisado 200  $\mu$ l de etanol 95-100°
- Vorteamos 10´´, es muy importante que se mezcle bien.

## 6. FIJACIÓN DNA A LA COLUMNA:

- Ponemos el contenido lisado en la columna.
- Centrifugamos a 6500 g durante 1´
- Transferimos la columna a un tubo nuevo de 2 ml.

## 7. PRIMER LAVADO:

- Añadimos 500  $\mu$ l a la columna de Wash Solution (antes del primer uso diluir con etanol).
- Centrifugamos a 6500 g durante 1´
- Transferimos la columna a un tubo nuevo de 2 ml.

## 8. SEGUNDO LAVADO:

- Añadimos 500  $\mu$ l a la columna de Wash Solution.
- Centrifugamos a máxima velocidad (12.000-16.000 g) durante 3´.
- Podemos centrifugar un minuto adicional a máxima velocidad la columna tras vaciar el líquido, para secar bien el etanol.
- Transferimos la columna a un tubo nuevo de 2 ml.

## 9. ELUCIÓN DEL DNA:

- Añadimos 200  $\mu$ l de Elution Solution en el centro de la columna.
- Para incrementar la eficiencia de la elución incubamos a TA durante 5´ antes de centrifugar la columna.
- Centrifugar a 6500 g durante 1´
- OPCIONAL: Repetir la elución.
- Obtenemos así 200  $\mu$ L de un concentrado de DNA.

**EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE MÚSCULO:**

Para la extracción del RNA siempre se debe trabajar en hielo. En primer lugar se realiza la lisis mecánica del tejido por medio del homogeneizador TissueLyser (Quiagen).

- En un tubo eppendorf que contiene 500  $\mu$ l de RNAPlus (Qbiogene) y una bola de acero (Quiagen) se introduce la muestra (biopsia muscular de aprox 5 mm x 3 mm).

- Se introducen los tubos en el Tissu Lyser y se agitan 30 segundos a 30.0 Hz
- Se vuelven a colocar los tubos en hielo y se le añaden otros 500 µl de RNAPlus
- De nuevo, se introducen los tubos en el Tissu Lyser y se agitan 30 segundos a 30.0 Hz
- Se vuelven a colocar los tubos en hielo durante 5 minutos
- Se transfieren las muestras a tubos RNase free limpios
- Se añaden 200 µl de Cloroformo. Las muestras siempre deben estar en hielo.
- Agitar 30 segundos en vórtex.
- Dejar 5 minutos en hielo
- Centrifugar 15 minutos a 14.000 rpm a 4°C
- Colocar las muestras en hielo y se observan 2 fases
- Se recoge la fase acuosa, la superior, sin tocar la interfase
- Volver a colocar en hielo
- Se añade un volumen (aprox 500 µl) de Isopropil alcohol
- Agitar manualmente volcando el eppendorf
- Dejar a 4°C durante mínimo 2 horas para que precipite (puede ser O/N o incluso fin de semana)
- Centrifugar 15 min a 13.000 rpm a 4 °C
- Quitar el sobrenadante y dejar sólo el pellet
- Añadir 450 µl de Etanol 80% (que se guarda a -20°C)

- Agitar con vórtex y ver que el pellet se despegue
- Centrifugar 15 minutos a 13.000 rpm a 4°C
- Quitar el sobrenadante como anteriormente se describe
- Se marca donde está el pellet y se deja secar con la tapa abierta (15-20 min aprox) hasta que se vuelva transparente
- Se añaden 30 µl de H<sub>2</sub>O RNase free y se mezcla bien con la pipeta. El RNA una vez extraído se almacena a -80 °C.

### RETROTRASCRIPTIÓN (RT-PCR) - OBTENCIÓN DE cDNA A PARTIR DE RNA:

<b>10X RT BUFFER</b>	<b>2 µl</b>
<b>25X dNTPs</b>	<b>0,8 µl</b>
<b>10X RNA Primer</b>	<b>2 µl</b>
<b>Multiscribe</b>	<b>1 µl</b>
<b>RNase Inhibitor</b>	<b>1 µl</b>
<b>H<sub>2</sub>O RNase Free</b>	<b>3,2 µl</b>
<b>RNA [1 µg]</b>	<b>10 µl</b>
<b>TOTAL</b>	<b>20 µl</b>

Una vez preparado el mix de la tabla anterior, lo colocamos en el termociclador y aplicamos el siguiente programa de amplificación:

25 °C	10 min	} 4 ciclos
37 °C	2 horas	
85 °C	5 segundos	
4 °C	indefinido	

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

De manera general para todos los genes estudiados los reactivos utilizados y las concentraciones de cada uno de ellos para llevar a cabo la reacción de PCR en un volumen final de 25  $\mu$ l fueron:

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>
Taq polimerasa	50 mM
Mezcla de nucleótidos	200 mM (cada uno)
Cebadores	50 nmoles/ $\mu$ l
Tampón	10x
MgCl <sub>2</sub>	50mM
ADN genómico	100 ng/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	Hasta volumen final

**GEL AGAROSA 2X:**

- 50 mL tampón TAE 1%
  - o TAE 50%:
    - 242 g Trizma Base
    - 51,1 mL ac.acético glacial
    - 100 mL EDTA 0,5M
    - Hasta 1L de Agua destilada
- 1 g Agarosa

Calentamos en microondas hasta quedar la agarosa disuelta, entonces añadimos 5  $\mu$ l de SYBR DNA GEL STAIN y vertemos en el molde que previamente hemos montado y colocado los peines. Esperamos unos 15 min hasta que solidifica. Tras esto desmontamos y cargamos las muestras.

**CARGAR MUESTRAS:**

- 3,5 uL de Loading Buffer 6x:
  - o 25 mg Azul de bromofenol
  - o 25 mg Xylene Cyanol FF
  - o 3,3 mL glicerol
  - o 6,7 mL agua destilada
- 4,5 uL de muestra

**CORRER GEL:**

Colocamos el gel en la cubeta horizontal y rellenamos con buffer TAE para mantener el pH a 8 y dejamos correr 5´ a 110 V.

**VISUALIZACIÓN GEL:**

Visualizamos el gel con luz azul de fluorescencia.

**PURIFICACIÓN DE LA PCR PARA SECUENCIACIÓN**

Tras confirmar que la amplificación ha sido correcta, se purifican las secuencias para ello se utilizó el kit ExoSAP-IT (USB corporation), que contiene las enzimas Exonucleasa I (recombinante) y fosfatasa alcalina (extraída de *Pandalus borealis*), en tampón de formulación especial.

- Añadiremos 2 µl de EXOSAP + 5 µl de la PCR.
- Le damos un pulso y lo metemos en la estufa a 37°C durante 15 minutos.
- Después, lo tendremos otros 15 minutos a 80°C.
- Finalmente lo podemos guardar congelado a – 20°C.

**PCR DE SECUENCIACIÓN**

Añadimos a las muestras 70 µl de agua destilada. Tras esto preparamos el BidDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit:

<b>BD</b>	0,5 µl
<b>Tampón</b>	1,25 µl

NOTA: Cantidades por muestra.



Tras esto pasamos a preparar el mix:

<b>BigDye</b>	1,75 µl
<b>Primer adecuado</b>	1,20 µl
<b>Muestra</b>	7,05 µl

Después colocamos el mix en el termociclador y aplicamos el siguiente programa:

<b>Inicio</b>	94°C	3 min
<b>25 ciclos</b>	96°C	10 sec
	50°C	5 sec
	60°C	4 min
<b>Final</b>	10°C	Indefinido

## PURIFICACIÓN PARA LA SECUENCIACIÓN

Para ello utilizamos el Sequencing Reacting Cleaning Kit de Millipore:

- Añadimos 20 µl de Sequencing wash solution a la muestra.
- Pasamos 30 µl a una placa del kit que contiene un filtro
- Aplicamos a dicha placa 4 min de vacío, para hacer pasar los 30 µl de líquido, quedándose en el filtro la secuencia.
- Añadimos 70 µl de Sequencing wash solution a la placa.
- Aplicamos 15 min de vacío.
- Añadimos a la placa 40 µl de Injection Solution.
- Agitamos la placa durante 10 min a 300 rpm.
- Por último pasamos a la placa de Secuenciación los 40 µl. NOTA: si en esta placa que vamos a introducir en el secuenciador quedan pocillos libres, añadiremos 40 µl de Injection Solution.

**SECUENCIACIÓN:**

Utilizamos para la secuenciación un secuenciador de 16 capilares AB 3130 xl Genetic Analyzer (permite colocar 2 placas de 96 pocillos a la vez y tarda en secuenciar las 2 placas 12 horas).

Colocamos las placas en el secuenciador, seleccionamos los parámetros:

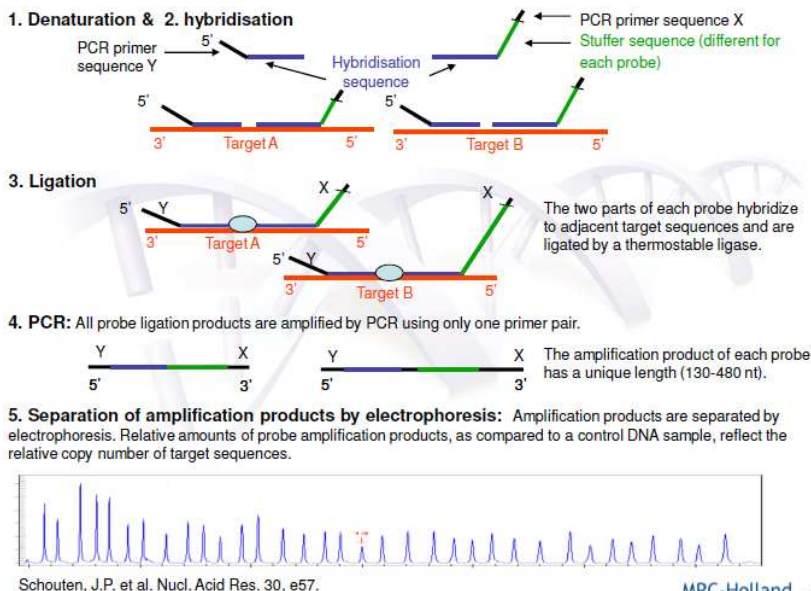
- Sequencing Analysis
- BD 3.1

Aplicamos el siguiente programa de secuenciación:

<b>Oven temperatura</b>	60°C
<b>Poly_full_vol</b>	6500 steps
<b>Current_stabiliti</b>	5 µAmp
<b>Pre-run Volt</b>	15 KVolt
<b>Pre-run time</b>	180 sec
<b>Inject Volt</b>	1,2 KVolt
<b>Inject time</b>	18 sec
<b>Volt n° of steps</b>	30 nK
<b>Volt step interval</b>	15 sec
<b>Data delay time</b>	126 sec
<b>Run Volt</b>	8,5 KVolt
<b>Run time</b>	2780 sec

## MLPA

## MLPA



## Protocolo MLPA®

## 1. Deanaturalizacion del DNA:

Calentar 5 minutos a 98 °C.

## 2. Hibridacion:

Añadir la SALSA probemix y el tampon MLPA.

Incubar 1 minuto a 95 °C.

Hibridar durante 16 h a 60 °C.

## 3. Ligamiento:

Añadir el mix de ligasas e incubar 15 minutos a 54 °C.

Tras esto inactivamos la ligase mediante calor (5 minutos at 98 °C).

## 4. Añadir los primers, dNTPs y la polimerasa, empezar la PCR.

## 5. Electroforesis capilar:

Exportamos las longitudes de los fragmentos y los picos de area a un software de analisis uhoja de datos para analizar los resultados.

### DETERMINACION ACCION ENZIMATICA GAA

Se extrae la de gota de sangre con agua y se aplica el siguiente protocolo:

- En una placa de 96 pocillos, todos los pocillos contienen sustrato y, o:
  - Tampón pH 3.8 + acarbosa
  - Tampón pH 3.8
  - Tampón pH 7.0
- Añadir la muestra a los pocillos de ensayo para iniciar la reacción. Se añade la muestra a los pocillos en blanco después de que la reacción ha terminado.
- Después de 20 horas de incubación , paramos la reacción. A continuación elaboramos la curva de calibración y leemos la fluorescencia.

### OBTENCION LINFOCITOS

- En un vacutainer CPT se obtienen 4 mL de sangre.
- Centrifugar a temperatura ambiente durante 20 min a 1500 rpm.
- Se extrae el suero para almacenar por un lado y por el otro se toma la capa de células blancas con una pipeta pasteur y se transfiere a un tubo que contiene 15 mL de tampón PBS 1x frio y mezclamos por inversion.
- Centrifugar a 300 rpm durante 15 min a 4 °C.

- Eliminar el sobrenadante con cuidado de no eliminar el pellet.
- Resuspender el pellet de células en 2 mL de tampón PBS 1x frío y almacenar a 80 °C.

